

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

pod tytułem

Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych

DOKTORANT

1. Imię i nazwisko: Marta Wozińska
2. Rok urodzenia: 1989
3. Ukończone studia: Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
4. Miejsce pracy: Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci, Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny w Białymstoku
5. Działalność naukowa: komunikaty zjazdowe, praca pogładowa, prace oryginalne.
łącznie punktacja 490 MEiN pkt., IF 19,265
6. Dziedzina: Nauk medycznych i nauk o zdrowiu
7. Dyscyplina: Nauki medyczne



PROMOTOR:

Dr hab. n. med. Artur Sulik

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

PROMOTOR POMOCNICZY:

Dr n. med. Kacper Toczyłowski

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi dr hab. n. med. Arturowi Sulikowi,

Promotorowi pomocniczemu dr n.med. Kacprowi Toczyłowskiemu

za opiekę merytoryczną, życzliwość

oraz pomoc podczas przygotowania niniejszej pracy.

Pracę dedykuję moim Rodzicom.

Spis treści

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	5
1.1 Prace oryginalne:	5
1.2 Prace przeglądowe:	6
2. Zestawienie publikacji	6
3. Wstęp	6
4. Cele pracy	7
5. Materiały i metody	8
5.1 Ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych wśród respondentów z północno – wschodniej Polski dotyczących chorób odkleszczowych.....	8
5.2 Diagnostyka w boreliozie z Lyme: ocena antygenów VlsE i C6 w kohorcie pediatrycznej	8
6. Wyniki	9
7. Wnioski	10
8. Praca przeglądowa	11
9. Praca oryginalna	21
10. Praca oryginalna	33
11. Streszczenie w języku polskim.....	46
12. Streszczenie w języku angielskim	48
13. Piśmiennictwo	49
14. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenia o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej.....	51

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1.1 Prace oryginalne:

- a. Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski D., Bojkiewicz E., Sulik A. „Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland” ;Vaccines MDPI 2023 ; 10, 12, 12 pp, ID 2163
IF – 7.8 , MEiN – 140 pkt
- b. Wozińska M., Toczyłowski K. Lewandowski D. Bojkiewicz E., Milewki R., Sulik A. „ Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”;
Diagnostics MDPI 2023
IF –3.6 , MEiN – 70 pkt

1.2 Prace przeglądowe:

- a. Woznińska M, Toczyłowski K., Sulik A. „, Wyzwania i nowe możliwości w diagnostyce boreliozy u dzieci ”; Przegląd Epidemiologiczny 2020; 74, 4, s. 652-661
MEiN – 40 pkt

2. Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MEiN
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	11,400	250
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	2	7,865	240
Streszczenia zjazdowe	7	0	0
Razem	12	19,265	250

3. Wstęp

Borelioza z Lyme (Lyme borreliosis; LB) to choroba, wywoływana przez kompleks bakterii *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l), obejmujący różne genogatunki [1]. LB przenoszona jest poprzez ukłucia kleszczy, a u dzieci, które są bardziej podatne na ukłucia w głowę i szyję, zwiększa ryzyko wystąpienia neuroboreliozy [2]. Duża zmienność genogatunków *Borrelia*, stanowi jedną z przyczyn zróżnicowanych objawów klinicznych choroby, obejmujących skórę, stawy, układ krwionośny oraz nerwy [3]. U dzieci i dorosłych manifestacja kliniczna boreliozy może być odmienna. U pacjentów pediatrycznych częściej występuje neuroborelioza w postaci aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, porażenia nerwów czaszkowych. U dorosłych natomiast obserwuje się radikulopatie i przewlekłe zanikowe zapalenie skóry [4].

Choroby przenoszone przez kleszcze (Tick-borne diseases; TBD) w tym LB, stanowią zagrożenie dla zdrowia, a ich częstość występowania wzrasta, częściowo z powodu zmian klimatycznych i stylu życia [5]. Globalny wzrost zachorowań na LB podkreśla znaczenie skutecznej ochrony przed tą chorobą, biorąc pod uwagę trudności w jej diagnostyce i leczeniu. Sukces szczepionki przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu (tick-borne encephalitis; TBE) wskazuje na możliwości zapobiegania boreliozie dzięki szczepieniom ochronnym. Obecnie będąca w fazie badań klinicznych białkowa szczepionka przeciwko boreliozie VLA15 ukierunkowana na antygeny OspA, wskazuje na ciągłe próby opracowania takich skutecznych szczepionek [6,7]. Do czasu wprowadzenia powszechnych szczepień profilaktyka boreliozy polega na unikaniu ukłuć przez kleszcze, kładąc nacisk na takie zachowania, jak noszenie odzieży ochronnej, sprawdzanie ciała po powrocie z terenów zielonych, szybkie usuwanie kleszczy i stosowanie repelentów [8]. Ocena wiedzy, postaw i praktyk (knowledge, attitudes and practices; KAP) ma kluczowe znaczenie w zapobieganiu infekcjom przenoszonym przez kleszcze.

Świadomość wśród pracowników służby zdrowia i ogółu społeczeństwa jest niewystarczająca, co podkreśla potrzebę inicjatyw edukacyjnych w celu zwiększenia zrozumienia zasad profilaktyki TBD i pozytywnego wpływu na zdrowie publiczne [9]. Pomimo dużego narażenia w naszym regionie, istnieje niewiele informacji na temat świadomości społecznej dotyczącej TBD, co wskazuje na potrzebę oceny wiedzy, postaw i zachowań związanych z LB i ukłuciami kleszczy.

Rozpoznanie boreliozy ze względu na różnorodne i niespecyficzne objawy wymaga potwierdzenia badaniem laboratoryjnym. Wyjątkiem jest rozpoznanie choroby w stadium rumienia wędrującego, opierającego się wyłącznie na obrazie klinicznym. Diagnostyka boreliozy opiera się na oznaczaniu poziomu swoistych przeciwciał. Do ich oznaczania wykorzystuje się testy immunoenzymatyczne (enzymy immunoassays; EIA). Każdy wynik dodatni w teście EIA powinien być potwierdzony testem jakościowym Western – Blot (WB) [10,11]. Zarówno testy EIA jak i WB stosują lizaty bakteryjne – antygeny natywne jak i antygeny wysoce specyficzne - rekombinowane. Zaleca się stosowanie testów wyższej generacji II i III, z antygenami rekombinowanymi, co niesie za sobą wystąpienie mniejszej ilości reakcji krzyżowych [12]. Konwencjonalna dwuetapowa metoda diagnostyczna (conventional two-tiered testing ;CTTT) obarczona jest pewnymi ograniczeniami: wspomnianymi wcześniej reakcjami krzyżowymi, niską czułością testu EIA we wczesnej fazie z wynikami fałszywie ujemnymi [13,14]. Ponadto metoda WB choć bardziej specyficzna, jest niestety czasochłonna i kosztowna [15]. Dodatkowo utrzymywanie się swoistych przeciwciał po leczeniu także stanowi wyzwanie dla klinicystów [16]. Aby zaradzić ograniczeniom CTTT, zaproponowano zmodyfikowane badanie dwupoziomowe (modified two-tiered testing; MTTT) [17]. W metodzie MTTT stosuje się dwa kolejne testy EIA bez WB, zawierające rekombinowane białka lub syntetyczne peptydy specyficzne dla *Borrelia burgdorferi*, takie jak antygen VlsE z jego fragmentem C6. Minimalizuje to reaktywność krzyżową i poprawia swoistość testu [18,19]. Amerykańska Agencja do Spraw Żywności (Food and Drug Administration ;FDA) zatwierdziła EIA z antygenami rekombinowanymi jako test potwierdzający, czyniąc WB opcjonalnymi [20]. Ponadto, warto zaznaczyć, że przeciwciała anty-VlsE i anty-C6 reagują dynamicznie na infekcję, szybko pojawiając się w osoczu pacjenta tuż po zakażeniu i zazwyczaj zmniejszając się po skutecznym leczeniu, co może być pomocne w monitorowaniu leczenia boreliozy [21].

Chociaż specyficzne antygeny w diagnostyce i monitorowaniu boreliozy u dorosłych są obiecujące, istnieją ograniczone dane dotyczące populacji pediatrycznej na obszarach endemicznych, takich jak Polska. Niniejsze badanie ma na celu wypełnienie tej luki poprzez ocenę testów VlsE i C6 we wczesnym stadium boreliozy u dzieci, ze szczególnym uwzględnieniem rumienia wędrującego i neuroboreliozy. Praca ocenia także zmienność przeciwciał u dzieci początkowo zdiagnozowanych przez lekarzy rodzinnych, a następnie skierowanych do specjalistów chorób zakaźnych, przyczyniając się do zrozumienia skuteczności testów serologicznych i wyników diagnostycznych w przypadkach pediatrycznych.

4. Cele pracy

1. Ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych wśród respondentów z północno-wschodniej Polski dotyczących boreliozy oraz zidentyfikowanie czynników wpływających na postawę i praktyki ludzi w zakresie profilaktyki przeciwko chorobom odkleszczowym.
2. Porównanie powszechnie zaakceptowanego dwuetapowego algorytmu diagnostycznego boreliozy wykorzystującego testy EIA i WB z proponowanym, alternatywnym algorytmem z użyciem testów EIA wykrywających antygeny rekombinowane (VlsE i C6).
3. Ocena użyteczności testów EIA wykrywających antygeny rekombinowane w monitorowaniu skuteczności leczenia boreliozy.

5. Materiały i metody

5.1 Ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych wśród respondentów z północno – wschodniej Polski dotyczących chorób odkleszczowych

Celem badania była ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych związanych z TBD wśród rodziców dzieci hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych Dzieci Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w północno-wschodniej Polsce. Badanie, realizowane w latach 2019-2021, obejmowało anonimową ankietę zawierającą 37 pytań.

W badaniu oceniano świadomość uczestników za pomocą pytań wielokrotnego wyboru na temat wiedzy odnośnie TBD, postępowania w przypadku ukłuc przez kleszcza i objawów boreliozy. Wiedzę na temat postępowania profilaktycznego i porównania wpływu TBD na zdrowie społeczeństwa w porównaniu do nowotworów i chorób układu krążenia, zmierzono za pomocą 10-punktowej skali Likerta. W badaniu oceniono także praktyki zapobiegawcze, uwzględniając preferowane metody ochrony przed ukłuciami kleszczy i stosowanie repelentów.

Zebrano dane demograficzne, historię pokłuc przez kleszcze, stosowanie szczepień ochronnych oraz źródła wiedzy na temat TBD. Analiza danych obejmowała wielowymiarowy model regresji logistycznej dwumianowej w celu zidentyfikowania czynników związanych z wiedzą i praktykami ochrony przed kleszczami.

5.2 Diagnostyka w boreliozie z Lyme: ocena antygenów VlsE i C6 w kohorcie pediatrycznej

Niniejsze badanie prospektywne skupiało się na dzieciach poniżej 19 roku życia, wykazujących objawy sugerujące LB i zostało przeprowadzone w Dziecięcym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w okresie od października 2019 r. do września 2022 r. Celem było pobranie próbek surowicy podczas pierwszej konsultacji oraz po 3, 6 i 12 miesiącach leczenia w celu monitorowania terapii. Do badania włączono w szczególności dzieci z wczesnymi objawami LB, takimi jak rumień wędrujący (erythema migrans; EM) i neuroborelioza (Lyme neuroborreliosis; LNB). Rozpoznanie EM opierało się na ustalonych kryteriach klinicznych dotyczących okrągłych, rumieniowych zmian o specyficznych cechach, potwierdzonych wywiadem, opisami rodziców lub zdjęciami. Rozpoznanie LNB przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych 2015, uwzględniając objawy neurologiczne, pleocytozę płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) oraz specyficzne przeciwciała w PMR. Wykluczono pacjentów z dodatnią serologią, ale bez specyficznych objawów. Przeprowadzono standardowe testy EIA, z interpretacją opartą na instrukcjach producenta i punktach odcięcia. Testy te porównano z zestawem Immunitics C6 Lyme ELISA. Specyficzne przeciwciała anti-VlsE wykryto przy użyciu anti- B. burgdorferi VlsE ELISA IgG z interpretacją na podstawie instrukcji producenta.

Analizy statystyczne obejmowały ocenę procentowej zgodności pomiędzy standardowymi testami EIA i EIA z antygenem C6 oraz zastosowanie testu Jonckheere-Terpstra do analizy trendu spadku przeciwciał anti-VlsE po leczeniu w różnych odstępach czasu. Względy etyczne spotkały się z akceptacją Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

6. Wyniki

6.1 Ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych wśród respondentów z północno – wschodniej Polski dotyczących chorób odkleszczowych

W badaniu wzięło udział 406 uczestników (82% kobiet, 18% mężczyzn) z północno-wschodniej Polski, regionu endemicznego TBD. Po usunięciu niekompletnych ankiet zebrano dane na temat narażenia na kleszcze, wiedzy, postaw i praktyk zapobiegawczych (KAP). Około 41% respondentów zostało ukłutych przez kleszcza w przeszłości, 16% w ciągu ostatniego roku, a 31% przyznało, że ich dziecko zostało ukłute w przeszłości.

Korzystając z 37-elementowej anonimowej ankiety papierowej oceniliśmy KAP u respondentów. Dwoma najpopularniejszymi źródłami wiedzy na temat TBD był internet i lekarz, wybranych odpowiednio przez 77,8% i 53,4%. Respondenci uważali, że posiadają umiarkowaną wiedzę na temat TBD i profilaktyki pokłuć przez kleszcze (mediana wyników odpowiednio 5/10 i 6/10). W badaniu uznano TBD za istotne zagrożenie dla zdrowia (mediana 8/10). Ujawniono jednak istotne braki w wiedzy i liczne błędne przekonania na temat choroby. Prawie co czwarty ankietowany nieprawidłowo zidentyfikował kleszcza na ilustracji. Aż 20% było przekonanych o wertykalnej transmisji boreliozy z matki na dziecko, a prawie 60% uważało, że borelioza jest chorobą nieuleczalną. Ponad połowa respondentów obawia się fragmentów kleszcza pozostających w skórze po jego usunięciu (mediana 10/10), jednocześnie uważając, że nie należy usuwać kleszcza samodzielnie. Ogólna ocena wiedzy (general knowledge score ; GKS) na temat TBD i ochrony przed kleszczami była umiarkowana (65%). Zdecydowana większość ankietowanych osób stosowała prawidłowe metody ochrony przed ukłuciami i słusznie nie oczekiwała poekspozycyjnej profilaktyki antybiotykowej, która została zaordynowana jedynie u 12% osób po ukłuciu przez kleszcza. Tylko 48,0% respondentów było pozytywnie nastawionych do szczepień przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu. Niedawne ukłucie kleszcza było natomiast powiązane z wyższym poziomem GKS i wyższym wynikiem TPS (tick protection practices scores) i pozytywnym nastawieniem do szczepionki na TBE (OR 2,10, 1,07–4,10, p = 0,030). Pozytywne nastawienie do szczepionek wiązało się także z pozyskiwaniem wiedzy TBD od lekarzy i innych zweryfikowanych źródeł medycznych. Wiek, miejsce zamieszkania i częste narażenie na kleszcze na terenach zielonych niezwiązane było z GKS, TPS ani podejściem do szczepionek.

6.2 Diagnostyka w boreliozie z Lyme: ocena antygenów VlsE i C6 w kohorcie pediatrycznej

Łącznie przebadano 354 dzieci, z czego 70 włączono do analizy (49 z rumieniem wędrującym i 21 z neuroboreliozą). Kryteria wykluczenia obejmowały niepotwierdzoną LB, niespecyficzne objawy, brak informacji klinicznych, brak badań kontrolnych. Wykluczenie uwzględniało także niewielką liczbę pacjentów, którzy nie mogli być ponownie skonsultowani z powodu pandemii Covid-19.

Mediana wieku pacjentów wyniosła 8 lat, z czego 61% stanowiły kobiety. Przypadki EM zostały zdiagnozowane klinicznie, natomiast przypadki LNB charakteryzowały się zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i lub porażeniem nerwu twarzewego. U wszystkich pacjentów LNB potwierdzono swoiste przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi*.

Zakończenie produkcji testu z antygenem C6 utrudniło kompleksową ocenę diagnostyczną. Jednakże przeciwciała anti-C6 wykryto w podgrupie 48 dzieci, w tym u 33 z EM i 15 z LNB. Oceniając skuteczność testu z antygenem C6 wykazano brak korelacji pomiędzy przeciwciałami w klasie IgG EIA i C6 oraz pomiędzy C6 i IgM EIA. Przeciwciała anti - C6 dobrze korelowały z IgG anti-VLsE. U

wszystkich 33 pacjentów z EM stwierdzono dodatnią odpowiedź przeciwciał na antygen C6. 80% pacjentów z LNB miało pozytywną odpowiedź w teście z antygenem C6, z różnicami w różnych podgrupach LNB. Niektórzy pacjenci z LNB bez pozytywnej odpowiedzi anty-C6 mieli niejednoznaczne wyniki przeciwciał anty-C6, ale w testach WB uzyskano u nich wynik pozytywny.

Poziomy IgG anty-VLsE dobrze korelowały ze standardowymi przeciwciałami w klasie IgG EIA. Pozytywną odpowiedź przeciwciał na antygen VLsE zaobserwowano u pacjentów z EM i LNB. W grupie EM po leczeniu antybiotykami zaobserwowano istotny spadek poziomu przeciwciał anty-VLsE. Natomiast w grupie pacjentów z LNB nie zaobserwowano istotnego spadku po terapii.

7. Wnioski

1. Respondenci mieszkający w północno-wschodniej Polsce uważają choroby przenoszone przez kleszcze za istotne zagrożenie dla zdrowia swojego i swoich rodzin, zbliżone do chorób nowotworowych i sercowo-naczyniowych.
2. W większości przypadków respondenci stosowali rekomendowane sposoby ograniczenia narażenia na ukłucia kleszczy oraz zapobiegania zachorowaniu na boreliozę. W niewielkim odsetku stosowano profilaktyczną antybiotykoterapię u respondentów lub ich dzieci.
3. Większość respondentów czerpała swoją wiedzę na temat chorób przenoszonych przez kleszcze z Internetu oraz od opiekujących się nimi lekarzy i te źródła należy wykorzystać, aby poszerzyć wiedzę populacji na temat tych chorób poprzez odpowiednią kampanię edukacyjną.
4. Większość dzieci spełniających kryteria kliniczne rozpoznania boreliozy z uwagi na oczywisty obraz rumienia wędrującego było adekwatnie leczonych przez lekarzy rodzinnych. Pomimo tego dzieci te zostały skierowane do poradni specjalistycznej celem objęcia dalszą opieką.
5. Część dzieci z rumieniem wędrującym ma ujemne wyniki badań serologicznych w kierunku boreliozy pomimo użycia testów z antygenami rekombinowanymi. Rozpoznanie kliniczne w tym stadium choroby powinno pozostawać złotym standardem diagnostyki i podstawą włączenia leczenia.
6. Zaobserwowano istotny spadek miana przeciwciał przeciwko rekombinowanemu białku VLsE w trakcie leczenia rumienia wędrującego oraz trend spadkowy w neuroboreliozie co może wskazywać na potencjał wykorzystania tych przeciwciał w monitorowaniu leczenia boreliozy u dzieci.

Marta Wozińska-Klepadło, Kacper Toczyłowski, Artur Sulik,

CHALLENGES AND NEW METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LYME DISEASE IN CHILDREN

WYZWANIA I NOWE MOŻLIWOŚCI W DIAGNOSTYCE BORELIOZY U DZIECI

¹Medical University of Białystok, Department of Pediatric Infectious Diseases
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci

ABSTRACT

Despite the constant development of biotechnology, laboratory diagnostics of Lyme disease in children still poses a significant challenge. The aim of this article is to present the current methods of Lyme disease diagnosis and its future perspectives.

A serological test is often the first step in supporting clinical diagnosis of Lyme disease in children. Recently, a new generation of enzyme-linked immunosorbent assays has been created. These assays use recombinant proteins or synthetic peptides in their antigenic spectrum. It is postulated that these tests may replace the classic immunoblot as the second step in the Lyme disease diagnostic protocol. Direct detection methods based on bacterial culture techniques or using the polymerase chain reaction (PCR) have inadequate sensitivity, which prevents their widespread use in clinical practice. Recently, a number of other tools have been developed that are of supportive importance. Among them, measuring of the CXCL13 chemokine concentration in the cerebrospinal fluid has the potential to become a routine procedure in the diagnosis of Lyme disease in children.

Future diagnostic strategies of Lyme disease might include: innovative immunological tests using new antigens, combining serology with direct methods in order to increase sensitivity, standardization of selected unconventional tests, identification of host response biochemical metabolic markers or linking clinical symptoms reported by patients with appropriate test panels.

In the absence of a vaccine which protects against the disease, the preventive recommendations given to parents to prevent tick bites in children remain valid.

Keywords: *Lyme disease, diagnosis, symptoms, serology, unconventional tests*

STRESZCZENIE

Pomimo ciągłego rozwoju biotechnologii, diagnostyka laboratoryjna boreliozy u dzieci pozostaje nadal niemałym wyzwaniem. Celem tej pracy jest przedstawienie obecnych możliwości diagnostycznych choroby z Lyme oraz perspektyw na nadchodzącą przyszłość.

Badanie serologiczne jest często pierwszym krokiem wspierającym diagnostykę kliniczną u dziecka chorego na boreliozę. W ostatnim czasie pojawiły się testy immunoenzymatyczne nowej generacji, które wykorzystują w swoim spektrum antygenowym rekombinowane białka lub syntetyczne peptydy. Postuluje się, iż testy te mogą zastąpić klasyczny immunoblot, jako drugi etap protokołu diagnostycznego boreliozy. Diagnostyka bezpośrednia oparta na technikach hodowli bakterii lub wykorzystująca reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) charakteryzuje się nadal nieadekwatną czułością, co uniemożliwia jej powszechne zastosowanie w praktyce klinicznej. W ostatnim czasie opracowano szereg innych narzędzi, które mają znaczenie pomocnicze. Wśród nich pomiar stężenia chemokiny CXCL13 w płynie mózgowo-rdzeniowym wydaje się być bliski rutynowego zastosowania u dzieci z neuroboreliozą.

Przyszłe strategie diagnostyczne boreliozy mogą polegać na: zastosowaniu nowatorskich testów immunologicznych wykorzystujących nowe antygeny, połączeniu serologii z metodami bezpośrednimi w celu poprawy czułości, standaryzacji niektórych niekonwencjonalnych testów, identyfikacji biochemicznych markerów meta-

bolicznych odpowiedzi gospodarza na zakażenie, czy też na odkryciu powiązań zgłaszanych przez pacjentów objawów klinicznych choroby z odpowiednimi panelami diagnostycznymi.

Wobec braku dostępnej szczepionki chroniącej przed zachorowaniem wciąż aktualne pozostają zalecenia profilaktyczne przekazywane rodzicom dzieci, które mają zapobiegać podkłuciom przez kleszcze.

Słowa kluczowe: borelioza, diagnostyka, objawy, serologia, testy niekonwencjonalne

INTRODUCTION

Lyme disease, also known as Lyme borreliosis, is a multi-organ bacterial disease that is transmitted through a tick bite. Its symptoms mainly affect the skin, joints, heart and nervous system. In the 1970s, in Old Lyme, Connecticut, USA, a series of cases of arthritis in children was reported. The symptoms were associated with the bites of ticks (1). It took many years to discover the cause of the disease – the bacteria named after its discoverer *Borrelia burgdorferi* (2). Identification of the etiological factor was certainly a milestone in understanding the etiopathology of the disease. However it did not become a remedy for diagnostic and therapeutic problems. Unfortunately, the diagnosis of Lyme disease still presents a significant challenge, despite the biotechnological breakthrough that has undoubtedly occurred in recent years. The techniques that directly detect the disease-causing microorganisms are the gold standard in the diagnosis of many infectious diseases, against which other diagnostic methods are compared. One of these techniques is molecular testing, which is a diagnostic tool in many diseases, including the recently recognized Zika virus infections or SARS-CoV-2.

DIRECT DIAGNOSTICS

Culture methods are useful tools for diagnosing infectious bacterial diseases. However, this does not apply to Lyme disease. Despite many attempts, the required sensitivity of these methods was not achieved. In a well-defined group of patients, the improved method of sampling together with the optimization of the medium composition gives positive culture results in only 47% of cases on the sixth day after the blood culture. This percentage does not increase to 94% until 16 weeks after the culture (3). These results come far too late for blood cultures to be of clinical significance. The culture method used in the case of skin biopsies collected from the area of erythema migrans, an early symptom of Lyme disease, has a sensitivity of only 50% (4-5). Moreover, this method is of limited use in children due to its invasiveness. Therefore, culture is not a routine procedure applicable in everyday clinical practice in the diagnosis of Lyme disease. This method is characterized by relatively low sensitivity. In addition, it requires a lot of time to obtain results

WSTĘP

Borelioza, znana także jako choroba z Lyme, jest wielonarządową chorobą bakteryjną przenoszoną przez ukłucie kleszcza. Jej objawy dotyczą przede wszystkim skóry, stawów, serca i układu nerwowego.

W latach siedemdziesiątych XX wieku w mieście Old Lyme w stanie Connecticut w USA opisano serię przypadków zapalenia stawów u dzieci. Objawy powiązано z ukłuciami kleszczy (1). Minęło wiele lat zanim ostatecznie rozpoznano przyczynę choroby - bakterię nazwaną później od nazwiska odkrywcy *Borrelia burgdorferi*. (2). Zidentyfikowanie czynnika etiologicznego było z pewnością kamieniem milowym w zrozumieniu etiopatologii choroby, jednak nie stało się remedium na istotne dla pacjentów problemy diagnostyczne i terapeutyczne. Wydaje się, że od czasu opisanie nowej choroby w miejscowości Old Lyme po dzień dzisiejszy, rozpoznanie boreliozy stanowi istotne wyzwanie, pomimo przełomu biotechnologicznego, który bezsprzecznie nastąpił w ostatnich latach. W diagnostyce wielu chorób zakaźnych złotym standardem, do którego porównuje się inne metody diagnostyczne, są techniki umożliwiające bezpośrednie wykrywanie mikroorganizmów odpowiedzialnych za wywoływanie choroby. Jedną z takich technik jest badanie molekularne, które obecnie stanowi narzędzie diagnostyczne wielu chorób, w tym niedawno poznanych zakażeń wirusem Zika, bądź SARS-CoV-2.

DIAGNOSTYKA BEZPOŚREDNIA

Metody hodowlane są użytecznym narzędziem stosowanym w diagnozowaniu bakteryjnych chorób zakaźnych. Nie dotyczy to jednak boreliozy. Pomimo wielu prób nie udało się uzyskać wysokiej czułości tej metody. W dobrze zdefiniowanej grupie chorych ulepszony sposób pobierania próbek wraz z optymalizacją składu pożywki daje pozytywne wyniki hodowli jedynie w 47% przypadków w szóstym dniu od posiewu krwi. Odsetek ten wzrasta do 94% dopiero w 16 tygodniu od wykonania posiewu (3). Jest to zdecydowanie za późno, by posiewy krwi miały istotne znaczenie kliniczne. Metoda hodowlana zastosowana w przypadku bioptatów skóry pobranych z okolicy rumienia wędrującego, wczesnego objawu boreliozy, charakteryzuje się czułością na poziomie zaledwie 50% (4-5). Ponadto metoda ta ma ograniczone zastosowanie

and an above-average proficiency in the use of modern techniques.

Histopathology is a method that could help observe the pathogen or the characteristic cell infiltration that could lead to the correct diagnosis. In case of Lyme disease, histopathology is recommended when lymphocytoma and acrodermatitis chronica atrophicans are suspected (6). Both of the above mentioned are extremely rare in children, therefore histopathological examination is not applicable to the most common forms of the disease in this age group.

Low amount of circulating *Borrelia burgdorferi* DNA is the reason why molecular techniques do not provide promising results in the early stage of the disease. It is estimated that the sensitivity of the PCR (polymerase chain reaction) method is comparable to the sensitivity of in vitro culture: it is calculated/evaluated ?? at 62% (7) in early Lyme disease, 38% in acute Lyme neuroborreliosis and 25% in chronic Lyme neuroborreliosis (8).

The unsatisfactory sensitivity of direct diagnostic methods can be improved by applying several such methods simultaneously. One of the studies (9) assessed the sensitivity of five direct diagnostic methods. At least one of these tests was positive in nearly 94% of untreated adults with erythema migrans. This study did not include a control group and because of this reason the specificity of the diagnostic approach using these methods could not be established. Detection of cell-free DNA fragments of *Borrelia burgdorferii* (cfDNA) in plasma may become another new approach supporting the diagnosis of Lyme disease in the early stages of the disease. A positive result was obtained in 64% of the samples from patients with confirmed erythema migrans. The combination of cfDNA determination with serology increased the diagnostic sensitivity to a promising 86% (10). Taking into account the fact that the detection of *Borrelia burgdorferi* using direct methods is of limited use, it should be considered whether relying only on commonly employed serological tests provides sufficient support for the clinical diagnosis of Lyme disease.

SEROLOGICAL DIAGNOSTICS

The Conventional Two-Tiered Testing (CTTT) of Lyme disease includes a first-tier enzyme immunoassay (EIA) followed by a supplemental immunoblot. This method is the most common tool supporting the clinical diagnosis of Lyme disease. There are studies that estimate the sensitivity of the two-stage diagnostic protocol reaches unrealistic 100% in the late stages of the disease (11), while other studies suggest 56% (12) or less (13). The fact that the tests are not fully standardized and the stages of the disease are

u dzieci z uwagi na jej inwazyjność. Hodowla nie jest więc rutynową procedurą mającą zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej w przypadku podejrzenia boreliozy. Cechuje ją stosunkowo niska czułość, długi czas potrzebny do uzyskania wyników oraz wymaga ponadprzeciętnej biegłości w stosowaniu nowoczesnych technik przez personel laboratorium.

Histopatologia to kolejna bezpośrednia technika, która mogłaby pomóc w uwidocznieniu patogenu lub wykazać obecność charakterystycznego nacieku komórkowego pomocnego w ustaleniu prawidłowego rozpoznania. Technika ta w przypadku boreliozy zalecana jest tylko w ocenie przypadków podejrzanych o chłoniaka boreliozowego lub przewlekłe zanikowe zapalenie skóry (6). Obie postaci są niezwykle rzadko spotykane u dzieci, tym samym badanie histopatologiczne nie ma zastosowania w najczęściej spotykanych postaciach choroby w tej grupie wiekowej.

Mała ilość krążącego DNA *Borrelia burgdorferi* jest powodem, dla którego nie widzimy obiecujących wyników stosowania technik molekularnych we wczesnym stadium choroby. Ocenia się, iż czułość metody PCR (ang. *polymerase chain reaction*) jest porównywalna z czułością hodowli *in vitro*: szacuje się ją na 62% (7) we wczesnym stadium boreliozy, 38% w ostrej neuroboreliozie i na 25% w przewlekłej neuroboreliozie (8).

Niezadowolająca czułość bezpośrednich metod diagnostycznych może być poprawiona poprzez zastosowanie kilku takich metod jednocześnie. Jedno z badań (9) oceniało pięć bezpośrednich metod diagnostycznych pod kątem czułości. Co najmniej jeden z tych testów był dodatni u niemal 94% pacjentów, w grupie nieleczonych dorosłych z rumieniem wędrującym. Badanie to było pozbawione próby kontrolnej, co nie pozwoliło na ustalenie swoistości podejścia diagnostycznego z wykorzystaniem tych metod. Wykrywanie wolno krążących w osoczu fragmentów DNA *Borrelia burgdorferii* (cfDNA) może stać się kolejnym nowym podejściem wspierającym diagnostykę boreliozy we wczesnym stadium choroby. Pozytywny wynik uzyskano w 64% próbek pochodzących od pacjentów z potwierdzonym rumieniem wędrującym. Połączenie oznaczania cfDNA z serologią zwiększyło czułość diagnostyczną do obiecujących 86% (10). Biorąc pod uwagę fakt, iż wykrywanie *Borrelia burgdorferi* metodami bezpośrednimi ma ograniczone zastosowanie, należałoby zastanowić się, czy poleganie jedynie na stosowanych powszechnie badaniach serologicznych może być obecnie wystarczającym wsparciem klinicznego rozpoznania boreliozy?

DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA

Klasyczna dwuetapowa strategia diagnostyki laboratoryjnej boreliozy (ang. CTTT: *Conventional Two*

not clearly defined, as well as the retrospective nature of many scientific studies, make it even more difficult to determine the actual sensitivity of the diagnostic technique used. As the infection with *Borrelia burgdorferi* progresses from early to late stage, an increase in the sensitivity of the test is observed. CTTT used in the late stages of Lyme disease shows high sensitivity. However, the late stages of the disease are rarely observed in pediatric patients. Serological tests are useless in the very early stages of the infection as it takes time to detect the body's antibody response. Diagnostic tests performed too early result in false-negative results, found in 70% of patients in the early stages of the disease (11). The immunoblot confirmation test is time-consuming, expensive, and characterized by lower sensitivity compared to EIA. However, its specificity is significantly higher than that of EIA. The immunoblot test may give a false negative result in the first weeks of infection. If the obtained result is questionable, a second test is required. IgM immunoblot is recommended only for the diagnosis of the early stage of the disease (up to 4 weeks) and should not be used in later diagnosis. Incorrect use of this technique in patients with prolonged, nonspecific symptoms may give a false positive result rather than an indication of an actual infection (14).

The Modified Two-Tiered Testing (MTTT) relies on two different sequential EIAs without the inclusion of an immunoblot (15). Serological tests using bacterial whole cell lysate as antigen are very sensitive, but may cross-react with other epitopes. A new type of EIA was developed that used recombinant proteins or synthetic peptides unique to *Borrelia burgdorferi*. Serological tests based on such epitopes may be useful as a second test in the MTTT. This is possible due to the minimal cross-reactivity of the new EIA test with foreign antigens. The antigen used in the new generation enzyme immunoassays is surface lipoprotein E (VlsE) or a selected part of it, most often the C6 peptide – epitope corresponding to the sixth invariant region (IR6) in VlsE (16). In vivo highly expressed antigens in VlsE can significantly improve the sensitivity of the test (17-19). The use of the C6 peptide derived from VlsE in the antigenic spectrum improves the specificity of the test compared to the EIA whole cell lysate (17, 20). Tests using the additional VlsE antigen could eventually replace immunoblotting as a confirmation test for Lyme disease. This strategy allowed the correct identification of patients with septic arthritis in a large group of children with symptoms of arthritis (21). The test has also been successfully used to evaluate the effectiveness of Lyme disease treatment (22-23), although repeating antibody-based testing is not routinely recommended in clinical practice.

-Tiered Testing), definiowana jest jako zastosowanie czułego testu immunoenzymatyczny (EIA), po którym wykorzystujemy uzupełniające wysoko swoiste badanie immunoblot. Ten scenariusz pozostaje najpowszechniej stosowanym narzędziem wspierającym diagnostykę kliniczną boreliozy. Istnieją badania, które szacują czułość dwuetapowego protokołu diagnostycznego w późniejszych manifestacjach choroby na nierealistyczne 100% (11), podczas gdy inni podają czułość na poziomie 56% (12) lub mniej (13). Brak pełnej standaryzacji testów, jak również brak jasnej definicji etapów choroby oraz retrospektywny charakter wielu opracowań naukowych sprawiają, że ustalenie faktycznej czułości zastosowanej techniki diagnostycznej staje się jeszcze trudniejsze. Wraz z progresją zakażenia *Borrelia burgdorferi*, od stadium wczesnego do późnego, obserwujemy wzrost czułości testu. Zastosowanie CTTT w późniejszej boreliozie odznacza się bardzo wysoką czułością. Jednak w grupie pacjentów pediatrycznych rzadko dochodzi do progresji do późnych postaci choroby. Badania serologiczne są bezużyteczne na bardzo wczesnym etapie zakażenia, ponieważ wykrycie odpowiedzi organizmu w postaci produkcji przeciwciał wymaga czasu. Zbyt wczesne wykonanie testu diagnostycznego skutkuje dużą liczbą wyników fałszywie ujemnych, spotykanych we wczesnym stadium choroby u 70% pacjentów (11). Test potwierdzenia immunoblot to czasochłonna i kosztowna procedura, która charakteryzuje się niższą czułością w porównaniu do EIA, lecz istotnie większą swoistością. Test immunoblot może dać wynik fałszywie ujemny w pierwszych tygodniach zakażenia, co w konsekwencji może prowadzić do potrzeby wykonania drugiego oznaczenia, gdy pierwszy wynik jest wątpliwy. Immunoblot IgM jest zalecany tylko do diagnostyki wczesnego stadium choroby (do 4 tygodni) i nie powinien być stosowany w późniejszej diagnostyce. Nieprawidłowe stosowanie tej techniki u pacjentów z przedłużającymi się, niespecyficznymi objawami, może raczej ujawnić fałszywie dodatnią reakcję, niż wskazywać na prawdziwe zakażenie (14).

Zmodyfikowany dwuetapowy algorytm testowania (ang: MTTT - *Modified Two-Tiered Testing*) opiera się na sekwencji dwóch różnych testów immunoenzymatycznych bez użycia metody immunoblot (15). Testy serologiczne wykorzystujące jako antygen pełny lizat bakteryjny są bardzo czułe, ale mogą reagować krzyżowo z innymi epitopami. Opracowano nowy typ testu immunoenzymatycznego, w którym zastosowano rekombinowane białka lub syntetyczne peptydy unikatowe dla *Borrelia burgdorferi*. Testy serologiczne oparte na takich epitopach mogą być przydatne jako drugi test w dwuetapowym zmodyfikowanym algorytmie MTTT. Możliwe jest to dzięki minimalnej reaktywności krzyżowej nowego testu EIA z obcymi

Low sensitivity in the early stage of Lyme disease is not the only problem that serological diagnostics poses. Another disadvantage is the persistence of specific IgM and IgG antibodies for months or years despite successful treatment (24). This results in repeated unnecessary antibiotic treatment until the serological response is no longer observed. Moreover, for children in endemic areas, previous tick bites might be responsible for positive test results. Another problem with the diagnosis of Lyme disease is the significant variability of the results in different laboratories (25). This is due to the variety of tests available on the market and different antigen panels used in them. Difficulties in interpreting test results from different laboratories result in repeated serological tests. This generates unnecessary stress in the child and increases the costs of diagnostics.

Serological tests are imperfect. Moreover, there are many misconceptions about the diagnosis of Lyme disease in children. Testing for Lyme disease in patients who do not meet the clinical criteria for the disease is not recommended and can lead to many false-positive results. This applies, for example, to the repeated ordering of serological tests in patients with autism spectrum disorder (26), although randomized studies have not proven any relationship between the occurrence of these behavioral deficits and Lyme disease (27). A patient with a positive Lyme disease test result faces multiple problems which derive from the diagnosis itself. It is particularly difficult to explain to the parents of the child the complex nature of false-positive results and the intricacies of serological diagnosis of Lyme disease. The desire to see a negative serological test result close to zero, rather than below the manufacturer's cut-off value, is another common misunderstanding of EIA interpretation rules. Some doctors use a series of serological tests after treatment is finished to meet the expectations of parents who demand clear evidence that their child was cured.

Some data from the literature suggest that standard diagnostic procedures may leave many Lyme cases undetected. One Canadian study uses an analysis of the incidence of Lyme disease in adjacent cross-border provinces and data from observation of the disease in dogs to predict the incidence of cases in humans (28). The authors speculate that the reported incidence of Lyme disease in humans is highly underestimated. The concept, or rather the myth of the seronegativity (29) of Lyme disease, adds even more fuel to the difficult-to-deny rumors about the disease.

UNCONVENTIONAL TESTS

A number of activities have been undertaken to develop completely new types of tests that would

antygenami. Antygenem użytym w testach immunoenzymatycznych nowej generacji jest powierzchniowa lipoproteina E (VlsE) lub jej wybrana część, najczęściej peptyd C6 – epitop odpowiadający szóstemu, niezmiennemu regionowi (IR6) w VlsE (16). Antygeny o wysokiej ekspresji *in vivo* w VlsE, mogą znacząco poprawić czułość testu (17-19). Wykorzystanie w spektrum antygenowym peptydu C6 pochodzącego z VlsE, poprawia swoistość testu w porównaniu do lizatu pełnokomórkowego EIA (17,20). Testy wykorzystujące dodatkowy antygen VlsE mogą ostatecznie zastąpić immunobloting jako test potwierdzający chorobę z Lyme. Taka strategia została oceniona na dużej grupie dzieci z objawami zapalenia stawów pozwalając prawidłowo zidentyfikować dzieci z septycznym zapaleniem stawów (21). Test został również z powodzeniem zastosowany do oceny skuteczności leczenia boreliozy (22-23), choć powtarzanie testów opartych o oznaczanie miana przeciwciał nie jest rutynowo zalecane w praktyce klinicznej.

Niska czułość we wczesnej fazie boreliozy nie jest jedynym problemem związanym z diagnostyką serologiczną. Inną wadą jest utrzymywanie się specyficznych przeciwciał IgM i IgG przez miesiące lub lata mimo skutecznego leczenia (24). Powoduje to powtarzalne, niepotrzebne leczenie antybiotykami w oczekiwaniu na ustąpienie odpowiedzi serologicznej. Co więcej, w przypadku dzieci zamieszkujących teryny endemiczne, pozytywny wynik testu może mieć związek z wcześniejszymi ukłuciami kleszczy. Innym problemem pojawiającym się w diagnostyce boreliozy jest znaczna zmienność wyników w zależności od wybranego laboratorium (25). Wynika to z różnorodności testów dostępnych na rynku i tym samym różnych paneli antygenowych wykorzystywanych przez testy opracowane przez poszczególnych producentów. Trudności w interpretacji wyników badań pochodzących z różnych laboratoriów przekładają się na powtarzanie badań serologicznych generując niepotrzebny stres u dziecka oraz mnożąc koszty diagnostyki.

Niedoskonałość testów serologicznych jest faktem. Ponadto, istnieje wiele błędnych przekonań na temat diagnostyki boreliozy u dzieci. Zlecenie testów na boreliozę u pacjentów, którzy nie spełniają kryteriów klinicznych choroby nie jest zalecane i może prowadzić do wielu fałszywie dodatnich wyników. Dotyczy to przykładowo wielokrotnego zlecenia testów serologicznych u pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (26), pomimo że w randomizowanych badaniach nie udowodniono żadnego związku występowania tych deficytów behawioralnych z boreliozą (27). Niezwykle trudno jest zdjąć z pacjenta „etykietaż” pozytywnego wyniku badania w kierunku boreliozy. Szczególną trudność sprawia wyjaśnienie rodzicom dziecka złożonej natury fałszywie dodatnich wyników

support the clinical diagnosis of Lyme disease. Among the many molecules that can be used in the diagnosis of Lyme disease, the chemokine CXCL13 seems to be the best known, although it is still not used in routine medical practice. CXCL13 is an important factor in the humoral immune response. Its elevated concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) induce the influx of B lymphocytes into the central nervous system, which results in intrathecal production of antibodies (30). The concentration of CXCL13 in the cerebrospinal fluid is elevated in neuroborreliosis in both adults and children (31-34). Interestingly, high concentration of CXCL13 may also be found in some patients suffering from other tick-borne diseases, namely tick-borne encephalitis (35). Additionally, a decrease in the concentration of CXCL13 may indicate that the implemented antibiotic therapy is effective (36). It is also speculated that the T-cell derived cell chemokine CCL19 (37) or IFN- α (38) may increase the risk of post-Lyme disease syndrome (PLDS). The syndrome is characterized by the presence of recurrent, persistent pain and fatigue after treatment, and its immunological nature is not fully understood. It should be noted that PLDS is extremely rare in children. Another innovative approach that supports the diagnosis of early stage of Lyme disease is the identification of metabolic biosignatures in the serum. The body's metabolic profile changes under the influence of various factors, including infection and infectious diseases. Consequently, these changes may reflect the existence of a number of diseases and be used in their diagnosis. Studies by Bryn et al. carried out using liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS) in people with early stage Lyme disease showed changes in the metabolic pathways of some lipids related to, inter alia, inflammatory response and mitochondrial functioning (39). In the future, metabolomics may help identify biomarkers that indicate successful treatment of Lyme disease (38-40). Another new idea for the future of Lyme disease diagnostics may be to find a typical signature of gene expression in the host organism (41). In studies of the transcriptome using the next generation sequencing (NGS) method in patients with newly diagnosed Lyme disease, it was observed that the change in the expression of certain genes is unique for this disease. Out of over 1,200 genes with altered expression compared to the control group, no more than 44% coincided with the signature of changes in other diseases. Identification of the transcriptome signature in the early stage of Lyme disease may be helpful in sensitive clinical diagnosis during the so-called serological window, before the antibody response occurs (41).

Bearing in mind the imperfections of Lyme disease diagnostics based on the results of laboratory tests, the

oraz zawilości diagnostyki serologicznej boreliozy. Chęć zobaczenia wartości ujemnego wyniku badania serologicznego w pobliżu zera, a nie poniżej określonej przez producenta wartości odcięcia, jest kolejnym częstym niezrozumieniem zasad interpretacji wyniku testu EIA. Niektórzy lekarze stosują więc serię testów serologicznych po zakończonym leczeniu, aby wyjść naprzeciw oczekiwaniom rodziców, którzy chcą otrzymać jednoznaczny dowód wyleczenia swoich dzieci.

Niektóre dane z literatury sugerują, iż standardowe procedury diagnostyczne mogą pozostawiać niewykrytą dużą liczbę przypadków boreliozy. Jedno z kanadyjskich badań wykorzystuje analizę częstości występowania boreliozy w sąsiednich prowincjach transgranicznych oraz dane z obserwacji choroby u psów, aby przewidzieć częstość występowania przypadków u ludzi (28). Autorzy spekulują, iż raportowana zapadalność na boreliozę u ludzi jest mocno zaniżona. Koncepcja, a raczej mit o seronegatywności (29) boreliozy, dodaje jeszcze więcej paliwa do trudnych do rozproszenia plotek o chorobie z Lyme..

NIEKONWENCJONALNE TESTY

Podjęto szereg działań mających na celu opracowania zupełnie nowych rodzajów testów, które wspierałyby kliniczne rozpoznanie boreliozy. Spośród wielu cząsteczek mogących mieć zastosowanie w diagnostyce boreliozy chemokina CXCL13, wydaje się być najlepiej poznana, choć wciąż nie jest wykorzystywana w rutynowej praktyce lekarskiej. CXCL13 jest ważnym czynnikiem humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Jej podwyższone stężenia w płynie mózgowo rdzeniowym (PMR) wywołują napływ limfocytów B do ośrodkowego układu nerwowego, co skutkuje wewnątrzoponowym wytwarzaniem przeciwciał (30). Stężenie CXCL13 w płynie mózgowo rdzeniowym jest podwyższone w neuroboreliozie zarówno u dorosłych, jak i u dzieci (31-34). Co ciekawe, stężenie CXCL13 może być również wysokie u niektórych pacjentów cierpiących na inne choroby odkleszczowe, a mianowicie kleszczowe zapalenie mózgu (35). Dodatkowo spadek jej stężenia może świadczyć o skuteczności wdrożonej antybiotykoterapii (36). Ponadto spekulowano rozważano również, że inna chemokina komórkowa CCL19 pochodząca z limfocytów T (37) czy też IFN- α (38) mogą być czynnikami ryzyka rozwoju zespołu poboreliozowego. Zespół ten charakteryzuje obecność nawracającego, uporczywego bólu i zmęczenia po leczeniu, a jego immunologiczny charakter nie jest do końca poznany. Należy zauważyć, iż zespół poboreliozowy niezwykle rzadko występuje u dzieci. Innym nowatorskim podejściem wspomagającym diagnostykę wczesnego stadium choroby w Lyme jest identyfikacja biosygnatur metabolicznych w surowicy pacjen-

idea of diagnosing the disease in children based on the clinical symptoms was put forward (42).

DIAGNOSIS BASED ON CLINICAL SYMPTOMS

Erythema migrans is an expanding rash often seen in the early stage of Lyme disease and the most common symptom of the disease in children. It is widely believed that erythema migrans, due to its key features such as location, size and appearance, enables the diagnosis of Lyme disease without additional laboratory tests. Unfortunately, this characteristic skin lesion does not occur in every patient, and even if it does, it often goes completely unnoticed. In children, erythema migrans is even more difficult to observe than in adults. In shorter children tick bites are more common on the head and neck than on the limbs (43-44). Nymphs and even adult ticks can be barely visible on the scalp, so a tick bite in this area may not be recognized for a long time. Moreover, sometimes the skin lesion's shape does not resemble the typical "bull's eye". Thus, it makes it more difficult to diagnose the disease. The diagnosis of Lyme disease requires for the erythema's diameter to be at least 5 cm (45), although this minimum size should be regarded only as a clue. Erythema migrans also requires differentiation from a local allergic reaction to a tick bite, which appears immediately after the bite, does not increase in diameter and may be accompanied by itching. Moreover, a significant percentage of children have multiple erythema migrans, defined as multiple skin lesions appearing outside the tick bite site (46). These patients need accurate differential diagnosis. Multiple erythema migrans requires careful differentiation from other erythematous changes found in children, such as hives, erythema multiforme or serum sickness.

SUMMARY

We need a breakthrough laboratory technique in the diagnosis of Lyme disease that will support clinicians in making treatment decisions. While significant progress has been made recently, there is still room for further development in this area. A sensitive diagnostic test that confirms only an active infection is still not available in clinical practice and remains every clinician's dream. In doubtful cases, the solution seems to be to combine the various techniques available, for example a new serological technique with advanced direct testing. Individualized diagnostics may be required for children with different symptoms of Lyme disease. It would be very difficult to develop a universal diagnostic protocol for every child with Lyme disease.

Profil metaboliczny organizmu zmienia się pod wpływem różnych czynników, w tym infekcji i chorób zakaźnych. Co za tym idzie zmiany w nim mogą odzwierciedlać stan choroby i być wykorzystywane do diagnostyki różnych chorób. Badania Bryna i współautorów przeprowadzone metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) u osób z wczesną fazą boreliozy wykazały zmiany w szlakach metabolicznych niektórych lipidów związanych między innymi z odpowiedzią zapalną i funkcjonowaniem mitochondriów (39). W przyszłości metabolomika może pomóc zidentyfikować biomarkery wskazujące na skuteczne leczenie choroby z Lyme (38-40). Kolejnym nowym pomysłem na przyszłość diagnostyki boreliozy może być znalezienie typowej sygnatury ekspresji genów w organizmie gospodarza (41). W badaniach transkryptomu metodą sekwencjonowania nowej generacji (*next generation sequencing* - NGS) pacjentów ze świeżo rozpoznaną boreliozą zauważono, że zmiana ekspresji niektórych genów jest unikatowa dla tej jednostki chorobowej. Spośród ponad 1200 genów o ekspresji zmienionej względem grupy kontrolnej, nie więcej niż 44% pokrywało się z sygnaturą zmian w innych jednostkach chorobowych. Identyfikacja trwałej sygnatury transkryptomu we wczesnej fazie boreliozy może stać się w przyszłości pomocna w czulej diagnostyce klinicznej, w „oknie serologicznym” jeszcze przed pojawieniem się odpowiedzi w postaci produkcji przeciwciał (41).

Mając na uwadze niedoskonałości diagnostyki choroby z Lyme opartej na wynikach badań laboratoryjnych wysunięto pomysł rozpoznawania choroby u dzieci bazując na objawach klinicznych choroby (42).

DIAGNOZA OPARTA NA OBECNOŚCI CHARAKTERYSTYCZNYCH OBJAWÓW KLINICZNYCH

Rumień wędrujący to stopniowo powiększająca się zmiana skórna, występująca we wczesnym stadium boreliozy, najczęstszy objaw choroby u dzieci. Powszechnie uważa się, iż rumień wędrujący ze względu na swoje kluczowe cechy takie jak lokalizacja, rozmiar i wygląd, pozwala na rozpoznania choroby z Lyme bez konieczności wykonywania dodatkowych badań laboratoryjnych. Niestety nie u każdego pacjenta na skórze pojawia się ta charakterystyczna zmiana skórna, niejednokrotnie też pozostaje kompletnie niezauważona. U dzieci zaobserwowanie rumienia wędrującego może być nawet trudniejsze, niż u dorosłych. U tych dzieci, które są niższego wzrostu, ukłucia kleszczy spotyka się częściej w okolicy głowy i szyi niż na kończynach (43-44). Nimfy, a nawet dorosłe kleszcze mogą być ledwo widoczne w skórze owłosionej głowy, dlatego ukłucie kleszcza w tej okolicy może być długo nieroz-

Due to the lack of uniform diagnostic protocols, which makes it difficult to provide appropriate therapeutic recommendations, the prevention of *Borrelia* infections is important. As immunization is currently unavailable, the only way to prevent Lyme disease is to avoid tick bites. Thus, avoiding risk areas, using tick repellents and wearing appropriate clothing is recommended. In addition, early tick removal is of great importance, because it prevents the transmission of infection from an infected tick. If a child is exposed to *Borrelia*, the history of recent antibiotic therapy should be carefully examined. Many children are treated for respiratory infections with beta-lactam or macrolide antibiotics several times a year. Thus it is possible that no additional treatment is required after the diagnosis of Lyme disease, because the patient already receives medication for another infection. Although there are numerous problems with the diagnostics of Lyme disease in children, there is also good news: children respond well to early treatment, and therefore long-term effects of the disease or the development of its chronic forms are unlikely in properly treated patients in this age group.

REFERENCES

1. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, et al. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 1977;20(1):7-17. doi:10.1002/art.1780200102
2. Burgdorfer W. How the discovery of *Borrelia burgdorferi* came about. *Clinics in Dermatology.* 1993;11(3):335-338. doi:10.1016/0738-081X(93)90087-S
3. Sapi E, Pabbati N, Datar A, Davies EM, Rattelle A, Kuo BA. Improved culture conditions for the growth and detection of *Borrelia* from human serum. *Int J Med Sci.* 2013;10(4):362-376. doi:10.7150/ijms.5698
4. Strle F, Nelson JA, Ruzic-Sabljic E, et al. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis.* 1996;23(1):61-65. doi:10.1093/clinids/23.1.61
5. Cerar T, Ruzic-Sabljic E, Glinsek U, Zore A, Strle F. Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):653-658. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02013.x
6. Tee S-I, Martínez-Escanamé M, Zuriel D, et al. Acrodermatitis chronica atrophicans with pseudolymphomatous infiltrates. *Am J Dermatopathol.* 2013;35(3):338-342. doi:10.1097/DAD.0b013e31826b7487
7. Eshoo MW, Crowder CC, Rebman AW, et al. Direct molecular detection and genotyping of *Borrelia*

poznane. Ponadto niekiedy zmiana skórna nie ma typowego wyglądu o kształcie przypominającym „tarczę strzelniczą” i tym samym rozpoznanie choroby może nie być tak oczywiste. Średnica rumienia pozwalająca na rozpoznanie boreliozy wynosi co najmniej 5 cm (45) choć ten minimalny rozmiar należy traktować jedynie orientacyjnie. Rumień wędrujący wymaga również różnicowania z miejscową reakcją alergiczną na ukąszenie kleszcza, która pojawia się zaraz po ukłuciu, nie zwiększa swojej średnicy oraz może towarzyszyć jej świąd. Ponadto u znacznego odsetka dzieci występuje rumień wędrujący mnogi definiowany jako liczne zmiany skórne pojawiające się poza pierwotnym miejscem ukłucia kleszcza (46). U tych pacjentów konieczna jest dokładna diagnostyka różnicowa. Mnogi rumień wędrujący wymaga wnikliwego różnicowania z innymi zmianami rumieniowymi spotykanymi u dzieci takimi jak pokrzywka, rumień wielopostaciowy lub reakcja typu choroby posurowiczej.

PODSUMOWANIE

W diagnostyce choroby z Lyme oczekuje się na przełomową technikę laboratoryjną, która wesprze klinicystów w rozpoznawaniu choroby i ich decyzjach dotyczących leczenia. Choć ostatnio poczyniono znaczące postępy, wciąż jest miejsce na dalszy rozwój w tym obszarze. Czuły test diagnostyczny, który potwierdza jedynie aktywną infekcję, wciąż nie jest dostępny w praktyce klinicznej pozostaje w „sferze marzeń” każdego klinicysty. W wątpliwych przypadkach rozwiązaniem wydaje się być łączenie różnych dostępnych technik, jak choćby nowej techniki serologicznej z zaawansowanymi testami bezpośrednimi. Być może konieczne będzie stosowanie diagnostyki zindywidualizowanej dla dzieci z różnymi objawami choroby z Lyme. Opracowanie uniwersalnego protokołu diagnostycznego dla każdego dziecka z chorobą z Lyme może być trudne do osiągnięcia.

Brak jednolitych protokołów diagnostycznych utrudniających wydanie właściwych zaleceń terapeutycznych sprawia, że istotna pozostaje profilaktyka zakażeń krętkami *Borrelia*. Ponieważ obecnie nie jest dostępne szczepienie ochronne, jedynym sposobem zapobiegania chorobie z Lyme jest unikanie ukąszeń przez kleszcze. Oznacza to omijanie obszarów zagrożonych, używanie środków odstraszających pajęczaki i stosowanie odpowiedniej odzieży. Nie można pominąć roli, jaką przypisuje się wczesnemu usuwaniu kleszczy, co zapobiega przeniesieniu zakażenia nawet w przypadku ukłucia przez zainfekowanego krętkami kleszcza. W przypadku narażenia dziecka na zakażenie *Borrelia* należy dokładnie zbadać wywiad odnośnie niedawno stosowanej antybiotykoterapii. Duża część dzieci kilka razy w roku jest leczona

- burgdorferi from whole blood of patients with early Lyme disease. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36825. doi:10.1371/journal.pone.0036825
8. Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis*. 1996;174(3):623-627. doi:10.1093/infdis/174.3.623
 9. Liveris D, Schwartz I, McKenna D, et al. Comparison of five diagnostic modalities for direct detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with early Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(3):243-245. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.03.026
 10. Branda JA, Lemieux JE, Blair L, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* Cell-free DNA in Human Plasma Samples for Improved Diagnosis of Early Lyme Borreliosis. *Clin Infect Dis* Published online June 25, 2020. doi:10.1093/cid/ciaa858
 11. Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for lyme disease. *Clin Infect Dis*. 2008;47(2):188-195. doi:10.1086/589242
 12. Stricker RB, Johnson L. Let's tackle the testing. *BMJ*. 2007;335(7628):1008. doi:10.1136/bmj.39394.676227.BE
 13. Cook MJ, Puri BK. Commercial test kits for detection of Lyme borreliosis: a meta-analysis of test accuracy. *Int J Gen Med*. 2016;9:427-440. doi:10.2147/IJGM.S122313
 14. Halperin JJ, Baker P, Wormser GP. Common misconceptions about Lyme disease. *Am J Med* 2013;126(3):264.e1-7. doi:10.1016/j.amjmed.2012.10.008
 15. Strobino B, Steinhagen K, Meyer W, et al. A Community Study of *Borrelia burgdorferi* Antibodies among Individuals with Prior Lyme Disease in Endemic Areas. *Healthcare (Basel)*. 2018;6(2). doi:10.3390/healthcare6020069
 16. Gomes-Solecki MJC, Meirelles L, Glass J, Dattwyler RJ. Epitope length, genospecies dependency, and serum panel effect in the IR6 enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(7):875-879. doi:10.1128/CVI.00122-07
 17. Branda JA, Linskey K, Kim YA, Steere AC, Ferraro MJ. Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2011;53(6):541-547. doi:10.1093/cid/cir464
 18. Branda JA, Aguero-Rosenfeld ME, Ferraro MJ, Johnson BJB, Wormser GP, Steere AC. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. *Clin Infect Dis*. 2010;50(1):20-26. doi:10.1086/648674
 19. Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, et al. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J Infect Dis*. 2003;187(8):1187-1199. doi:10.1086/374395
 20. Wormser GP, Schriefer M, Aguero-Rosenfeld ME, et al. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(1):9-15. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.003
 21. Nigrovic LE, Bennett JE, Balamuth F, et al. Diagnostic Performance of C6 Enzyme Immunoassay for Lyme Arthritis. *Pediatrics*. 2020;145(1). doi:10.1542/peds.2019-0593
 22. Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J Infect Dis*. 2001;184(7):870-878. doi:10.1086/323392
 23. Philipp MT, Wormser GP, Marques AR, et al. A decline in C6 antibody titer occurs in successfully treated patients with culture-confirmed early localized or early disseminated Lyme Borreliosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(9):1069-1074. doi:10.1128/CDLI.12.9.1069-1074.2005
 24. Feder HM, Gerber MA, Luger SW, Ryan RW. Persistence of serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme disease. *Clin Infect Dis*. 1992;15(5):788-793. doi:10.1093/clind/15.5.788
 25. Fallon BA, Pavlicova M, Coffino SW, Brenner C. A comparison of lyme disease serologic test results from 4 laboratories in patients with persistent symptoms after antibiotic treatment. *Clin Infect Dis*. 2014;59(12):1705-1710. doi:10.1093/cid/ciu703
 26. Bransfield RC, Wulfman JS, Harvey WT, Usman AI. The association between tick-borne infections, Lyme borreliosis and autism spectrum

- disorders. *Med Hypotheses*. 2008;70(5):967-974. doi:10.1016/j.mehy.2007.09.006
27. Ajamian M, Kosofsky BE, Wormser GP, Rajadhyaksha AM, Alaedini A. Serologic markers of Lyme disease in children with autism. *JAMA*. 2013;309(17):1771-1773. doi:10.1001/jama.2013.618
 28. Lloyd VK, Hawkins RG. Under-Detection of Lyme Disease in Canada. *Healthcare (Basel)*. 2018;6(4). doi:10.3390/healthcare6040125
 29. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Thomas J, Golightly MG. Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med*. 1988;319(22):1441-1446. doi:10.1056/NEJM198812013192203
 30. Irani DN. Regulated Production of CXCL13 within the Central Nervous System. *J Clin Cell Immunol*. 2016;7(5). doi:10.4172/2155-9899.1000460
 31. Markowicz M, Schötta A-M, Kundi M, et al. CXCL13 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other neurological disorders determined by Luminex and ELISA. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9(5):1137-1142. doi:10.1016/j.tbd.2018.04.008
 32. Pietikäinen A, Oksi J, Hytönen J. Point-of-care testing for CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(3):226-228. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.013
 33. Remy MM, Schöbi N, Kottanattu L, Pfister S, Duppenhaler A, Suter-Riniker F. Cerebrospinal fluid CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis in children: a retrospective case-control study. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):173. doi:10.1186/s12974-017-0948-9
 34. Barstad B, Tveitnes D, Dalen I, et al. The B-lymphocyte chemokine CXCL13 in the cerebrospinal fluid of children with Lyme neuroborreliosis: associations with clinical and laboratory variables. *Infect Dis (Lond)*. 2019;51(11-12):856-863. doi:10.1080/23744235.2019.1671988
 35. Toczyłowski K, Grygorczuk S, Osada J, et al. Evaluation of cerebrospinal fluid CXCL13 concentrations and lymphocyte subsets in tick-borne encephalitis. *Int J Infect Dis*. 2020;93:40-47. doi:10.1016/j.ijid.2020.01.023
 36. Yang J, Han X, Liu A, et al. Chemokine CXC Ligand 13 in Cerebrospinal Fluid Can Be Used as an Early Diagnostic Biomarker for Lyme Neuroborreliosis: A Meta-Analysis. *J Interferon Cytokine Res*. 2017;37(10):433-439. doi:10.1089/jir.2016.0101
 37. Aucott JN, Soloski MJ, Rebman AW, et al. CCL19 as a Chemokine Risk Factor for Posttreatment Lyme Disease Syndrome: a Prospective Clinical Cohort Study. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(9):757-766. doi:10.1128/CVI.00071-16
 38. Jacek E, Fallon BA, Chandra A, Crow MK, Wormser GP, Alaedini A. Increased IFN α activity and differential antibody response in patients with a history of Lyme disease and persistent cognitive deficits. *J Neuroimmunol*. 2013;255(1-2):85-91. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.10.011
 39. Fitzgerald BL, Molins CR, Islam MN, et al. Host Metabolic Response in Early Lyme Disease. *J Proteome Res*. 2020;19(2):610-623. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00470
 40. Molins CR, Ashton LV, Wormser GP, et al. Development of a metabolic biosignature for detection of early Lyme disease. *Clin Infect Dis*. 2015;60(12):1767-1775. doi:10.1093/cid/civ185
 41. Bouquet J, Soloski MJ, Swei A, et al. Longitudinal Transcriptome Analysis Reveals a Sustained Differential Gene Expression Signature in Patients Treated for Acute Lyme Disease. *mBio*. 2016;7(1):e00100-00116. doi:10.1128/mBio.00100-16
 42. Lyme Disease 135, 136 | Red Book® 2018 | Red Book Online | AAP Point-of-Care-Solutions. Published September 6, 2020. Accessed September 6, 2020. <https://redbook.solutions.aap.org/chapter.aspx?sectionId=189640125&bookId=2205&resultClick=1>
 43. Cull B, Pietzsch ME, Gillingham EL, McGinley L, Medlock JM, Hansford KM. Seasonality and anatomical location of human tick bites in the United Kingdom. *Zoonoses Public Health*. 2020;67(2):112-121. doi:10.1111/zph.12659
 44. Hügli D, Moret J, Rais O, et al. Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland. *Int J Med Microbiol*. 2009;299(2):155-160. doi:10.1016/j.ijmm.2008.06.001
 45. Vig DK, Wolgemuth CW. Spatiotemporal Evolution of Erythema Migrans, the Hallmark Rash of Lyme Disease. *Biophys J*. 2014;106(3):763-768. doi:10.1016/j.bpj.2013.12.017
 46. Glatz M, Resinger A, Semmelweis K, Ambros-Rudolph CM, Müllegger RR. Clinical spectrum of skin manifestations of Lyme borreliosis in 204 children in Austria. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(5):565-571. doi:10.2340/00015555-2000

Received:30.11.2020 r.

Accepted for publication:14.12.2020 r.

Otrzymano: 30.11.2020 r.

Zaakceptowano do publikacji: 14.12.2020 r.

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med. Artur Sulik

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci, Uniwersytet

Medyczny w Białymstoku,

ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok

telefon: 85 745 06 85

e-mail: artur.sulik@umb.edu.pl

Article

Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland

Marta Wozinska, Kacper Toczyłowski , Dawid Lewandowski, Ewa Bojkiewicz and Artur Sulik * 

Department of Pediatric Infectious Diseases, Medical University of Białystok, Waszyngtona 17, 15-274 Białystok, Poland

* Correspondence: artur.sulik@umb.edu.pl; Tel.: +48-857450685

Abstract: (1) Background: The incidence of Lyme borreliosis (LB) is increasing in Europe. The new LB vaccine is still in clinical development, thus the dissemination of knowledge about the disease is essential. We assessed the knowledge, attitudes and preventive practices (KAP) against tick-borne diseases (TBDs) of people living in the endemic area in northeastern Poland. (2) Methods: We surveyed 406 adults using a 37-item anonymous paper survey. The data were analyzed with regression models. (3) Results: The two most popular knowledge sources were the Internet and doctors, selected by 77.8% and 53.4%, respectively. Respondents felt moderately knowledgeable about TBDs and tick bite prophylaxis (median scores 5/10, and 6/10, respectively), considered TBDs to be a significant health threat (median 8/10), attributed high risk to tick mouthparts remaining in the skin after tick removal (median 10/10), and shared multiple misconceptions regarding LB transmission, symptoms, and management. General knowledge scores (GKS) about TBDs and tick protection practices scores (TPS) were moderate (65.0%; IQR, 55.8–71.7%, 63.6%; 54.5–72.7%, respectively). Only 48.0% had a positive attitude towards TBE vaccination. A recent tick-bite was associated with higher GKS (OR, 2.55; 95% CI, 1.27–5.10; $p = 0.008$), higher TPS (OR 4.76, 95% CI, 2.0–11.1; $p < 0.001$), and a positive attitude towards TBE vaccine (OR 2.10, 1.07–4.10, $p = 0.030$). A positive vaccine attitude was also associated with obtaining TBD knowledge from doctors and other verified sources (OR, 2.654, 1.66–4.23; $p < 0.001$). Age, place of residence, and frequent exposure to ticks in green areas were not associated with GKS, TPS, nor vaccine attitude. (4) Conclusions: Increased risk perceptions are associated with adoption of behaviors preventing TBDs. Medical professionals play an important role in communicating knowledge about TBDs. There is a need to revise current communication strategies with respect to tick bites and prevention of LB and other TBDs.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*; Lyme borreliosis; tick bite; tick-borne diseases; Lyme vaccine



Citation: Wozinska, M.; Toczyłowski, K.; Lewandowski, D.; Bojkiewicz, E.; Sulik, A. Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland. *Vaccines* **2022**, *10*, 2163. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122163>

Academic Editor: Pedro Plans-Rubió

Received: 10 November 2022

Accepted: 14 December 2022

Published: 16 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tick-borne diseases (TBDs) pose a great health risk to people living in endemic areas. The most common TBDs include Lyme borreliosis (LB) and tick-borne encephalitis (TBE) [1]. In Europe, the main vector of LB is the tick *Ixodes ricinus*, and the most cases are reported in the northern and central-eastern part of the continent [2,3].

LB is caused by *Borrelia burgdorferi* spirochetes of the *Spirochaetaceae* family, a part of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex [4]. The *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex is a very diverse group of bacteria. Based on various studies, numerous spirochete genospecies have been identified, and more are expected to be discovered in the future [4]. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelli* and *Borrelia garinii* dominate among the species commonly infecting humans [5]. The heterogeneity of *Borrelia* spirochetes is one of the reasons for the diversity of clinical symptoms of the disease [6] that can affect skin, joints, heart, or the peripheral or central nervous system [7]. The serological diagnosis of LB is a great challenge due to the number of *Borrelia* species, their different geographical

distribution, similarity to other pathogenic spirochetes resulting in the possibility of cross-reactions, and the location of the infection in immunologically privileged sites [8–11].

The incidence of LB is increasing in many countries. One of the reasons is the observed warming of the climate, which is conducive to the expansion of ticks to higher altitudes and towards poles. There is, however, an observable decrease in tick populations in geographical regions that became too hot and dry due to the climate change [12]. Additionally, the increase in LB incidence may be caused by the development of tourism, lifestyle changes and popularization of outdoor sports as well as better knowledge and notification of the cases by the physicians [1,13]. A similar increasing trend has been observed in Poland in recent decades [14]. Only in the period from 2020 to 2021 there was a decrease in the number of reported cases of LB, which could be related to the outbreak of the SARS-CoV-2 pandemic and the resulting limited access to diagnostics. This decrease in reported cases resulted from the effects of the pandemic on TBD surveillance rather than an actual decrease in the numbers of tickborne diseases. The data showed that incidence LB reduced compared to prior years [15]. In Poland, the highest incidence is recorded in the northeastern part of the country, where our research was conducted [14].

With increasing rates of LB all around the globe, as well as the challenging serodiagnostics and treatment, protecting people from the disease becomes more important than ever. The undoubted success of the TBE vaccine in reducing the incidence of tick-borne encephalitis in endemic areas indicates that it is the right way to reduce the incidence of LB [16]. Researchers have been searching for an effective vaccine against LB since the 1970s. A vaccine based on the outer surface protein A (OspA) lipoprotein was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in the United States in 1998 [17]. A number of unfavorable reports and the activity of anti-vaccine movements contributed to the withdrawal of this vaccine [18,19]. Recently, a new attempt to develop a vaccine has been made, for instance vaccine VLA15 which also targets the OspA of *Borrelia burgdorferi* [20,21] or LB vaccine using mRNA to encode tick saliva proteins [22].

Final registration and public acceptance of vaccination against *Borrelia* will provide real protection against the disease caused by the bacteria. Until then, tick bite prophylaxis and its consistent application is the only method of protection against the disease [23]. Avoiding places with high grass, hiking in the middle of the trails, avoiding leaf litter, wearing long-sleeved clothing, carrying out tick control on the whole body and removing ticks promptly is included to taking steps to protect from getting a tick bite. Research shows, that the use of repellent is one of the least frequently chosen methods of tick protection, probably due to the high cost and the false perception that these products may be toxic to the skin [24].

Assessment of knowledge, attitudes and practices (KAP) in the exposed population is an important element in the prevention of infection with tick-borne pathogens [25,26]. Previous studies pointed that TBD awareness among healthcare professionals [25,27], people living in endemic area [26], and foresters [28] was inadequate. However, respondents had a favorable attitude towards a future LB vaccine [25,28,29]. Increasing the knowledge through appropriate educational activities could improve TBD awareness, reduce the exposure to tick bites, and thus have a positive impact on public health.

Although exposure to TBDs is particularly high in our geographic region, little is known about TBD awareness. The aim of our study is to assess the knowledge and attitudes of respondents to TBDs, in particular LB, as well as to learn about behaviors related to tick bites.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Setting

The survey, based on an anonymous questionnaire consisting of 37 questions, was conducted at the Department of Pediatric Infectious Diseases, Medical University of Białystok in 2019–2021. The participants of the study were recruited among parents of children hospitalized in the above-mentioned department. All respondents lived in northeastern Poland,

which is endemic for TBDs. The research was conducted with the consent of the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (approval number R-I-002/489/2019)

The questionnaire assessed knowledge, attitudes, and preventive practices against TBDs. In questions assessing knowledge, we used multiple choice questions. Attitudes and practices were determined using a fully labelled 10-point Likert scale, ranging from “of little importance” to “highly important”.

In the area of knowledge, we asked respondents to choose TBDs from a list of various health conditions, identify a tick on an illustration, select correct tick bite management, and also point symptoms, ways of transmission and methods of treatment of LB. The General Knowledge Score (GKS) was calculated on the basis of the number of correct answers. To assess the attitude towards TBDs we asked respondents to compare disease burden that they associate with TBDs, cancer and cardiovascular disease (CVD). Additionally, the respondents were asked if tick mouthparts remaining in the skin after tick removal pose any health danger, and if they or their child received a postexposure prophylaxis with antibiotics after a tick bite. Preventive practices were assessed by determining preferable tick bite protection methods, and use of repellents. The responses were then rated, and the tick protection score (TPS) was calculated by adding +1 point to a sum for every proper method labelled by the respondent as important (7 points or more in the Likert scale) and for every ineffective method or unimportant repellent characteristic labelled as nonimportant (4 points or less). For instance, an individual receives 8 points if they reported buying a repellent in the last year, and gives at least 7 out of 10 points in the Likert’s scale (interpreted as important) for post exposure body inspection, washing clothes post exposure, using proper clothing while outdoors, treating clothes with repellents and applying topical repellents on skin, while gives 4 points or less (interpreted as “unimportant”) to use of electronic repellents and oral supplements. For giving 4 points or less to pleasant smell, natural ingredients and lack of DEET as qualities of a repellent, an additional 3 points were added to a maximum score of 11. Additionally, we calculated a second index of tick protection, named “poor repellent practice”, defined as answering two or more of the following: not buying repellents, preferring products without DEET, preferring products containing natural ingredients, and preferring products having a pleasant smell (defined as rating 5 points or more in the 10-point Likert’s scale). We also assessed attitudes to the tick-borne encephalitis vaccine, which is the only vaccine used in prevention of TBDs in humans currently.

2.2. Information about the Interviewees

The collected data included: demographic data (gender, age, education level, place of residence), frequency of staying in green areas, past and last year tick bites, history of tick bites in the respondents’ children. Additionally, the participants of the study were asked about the sources of knowledge about TBDs and the prevention of tick bites, as well as about the occurrence of TBDs in the immediate family.

2.3. Data Analysis

The quality of this survey was asserted by two small ($n = 20$) pilot phases, during which we distributed the first versions of the survey among the hospital staff. After collecting the feedback, we improved the quality of the survey and prepared the final version of the questionnaire. Data were collected with anonymous questionnaires printed on paper. Subsequently, it was entered and compared by 3 independent people using Microsoft Excel, which reduced the risk of errors. Vague responses were reviewed by the principal investigator to determine the correct answer. We removed surveys that were illegible or in which the majority of answers were missing. In the case of only a few key answers missing we included this questionnaire but accounted for missing data in the analysis. Before the analysis we checked if the proportion of missing data is below 5% in each question.

The multivariate binominal logit regression model with the backward stepwise method was used to calculate factors associated with knowledge about TBDs, and tick protection practices. The results are presented as odd ratios (OR) with corresponding 95% confidence intervals (95% CI). Variables describing all personal factors (age, sex, place of residence, education, exposure to tick bites) were included in these analyzes as confounders. The relative disease burden assessed by the respondents was compared in one-way mixed-effects ANOVA and Tukey's multiple comparisons post hoc test. A p -value less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using TIBCO Software Inc. (2017) Statistica, version 13 (Palo Alto, CA, USA) and GraphPad Prism version 9.4.0 for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Group

After removing 59 incomplete surveys, we included 406 questionnaires collected from 325 women (82%, 325/397), 72 men (18%, 72/397), and 9 people (2%) who did not specify their gender. One hundred sixty-one respondents (41%) had been bitten by a tick in the past at least once, and 66 (16%) of them were bitten within the last year. Moreover, 21 (5%) respondents had been bitten by a tick more than once. Additionally, 123 (31%) respondents answered that their child had been bitten by a tick at least once, and 40 (10%) more than once (Table 1).

Table 1. Personal characteristics of the respondents.

Individual—Related Characteristic	Number (%)
Gender	406 (100%)
Male	72/397 (18%)
Female	325/397 (82%)
Age	400 (100%)
<29	74/400 (18%)
30–39	235/400 (59%)
40–49	79/400 (20%)
>49	12/400 (3%)
Education	400 (100%)
Primary	10/400 (2%)
Secondary	88/400 (22%)
Vocational	37/400 (9%)
Higher	267/400 (67%)
Place of residence	397 (100%)
Rural	165/397 (42%)
Urban	232/397 (58%)
Bitten by a tick in the past	161/388 (41%)
Bitten by a tick in the last year at least once	66/402 (16%)
Bitten by a tick in the last year more than once	21/405 (5%)
Respondent's child bitten by a tick in the past	123/393 (31%)
Respondent's child bitten by a tick more than once	40/405 (10%)

Data presented as frequencies and percentages. Denominators lower than the study group indicate missing data.

3.2. Knowledge

The median GKS result was 65.0% (interquartile range (IQR), 55.8%, 71.7%). Using the regression model, we analyzed the differences between the respondents with high level of knowledge (GKS score above the median value) and the respondents with low levels of knowledge (GKS below the median value) in order to identify variables correlated with the knowledge levels. Respondents with high levels of general knowledge more often graduated from a university (OR, 1.70, 95% CI, 1.01–2.85; $p = 0.047$), felt more confident

about TBD and prophylaxis (OR, 2.62; 95% CI, 1.55–4.41, $p < 0.001$), were more likely to be bitten by a tick recently (OR, 2.55; 95% CI, 1.27–5.10, $p = 0.008$), and were less likely to have a poor repellent practice (OR, 0.58; 95% CI, 0.36–0.94). High level of knowledge was also associated with not accepting unverified treatment for Lyme borreliosis, for instance: supplementation with vitamins, homeopathy, hydrocolonotherapy, hyperbaric chamber therapy, ozone therapy, bioresonance therapy, chelation therapy and therapy with intravenous vitamin C. Unverified treatment for Lyme disease was more often suggested by respondents with lower GKS scores (OR, 1.75; 95% CI, 1.04–2.95, $p = 0.036$). Knowledge scores were not associated with sex, age, place of residence, and exposure to ticks in green areas.

The majority of the respondents (77.8%) use the Internet as their source of information on TBDs and tick bite prophylaxis. The second most popular knowledge source were doctors selected by 53.4%. A total of 153 (37.7%) respondents relied on non-verified sources of knowledge about TBDs only (the Internet, friends, popular science literature, other people diagnosed with TBDs, TV and radio). Respondents who relied on verified sources of knowledge (doctors, pharmacists, official medical websites and textbooks) were more likely to be under 30 years of age (OR, 2.36, 1.21–4.61, $p = 0.012$), have a positive attitude towards TBE vaccines (OR 2.82, 1.71–4.64, $p < 0.001$), have a child bitten by a tick (OR 2.12, 1.19–3.77, $p = 0.011$), and were bitten by a tick anytime in the past (OR 2.50, 1.46–4.28, $p = 0.001$).

Common misconceptions and myths about the diseases and the principles of their prevention were revealed by the survey. Lyme disease, tick-borne encephalitis, and babesiosis were the best-known TBDs, selected by 96.8%, 83.5%, and 26.1% of the respondents. The least known TBDs were anaplasmosis (12.6%), tularemia (8.4%), rickettsiosis (7.1%) and ehrlichiosis (5.9%). Other health conditions were commonly attributed to tick bites: congenital LB was selected by 20.0%, autoimmune disorders by 9.1%, miscarriage by 4.9%, toxoplasmosis by 4.7%, and malaria by 2.7%. Only 77% of the respondents properly identified a tick on a picture. A bed bug (*Cimex lectularius*) and a dust mite (*Dermatophagoides pteromyssinus*) were mistaken for ticks by 10.6% and 5.9% of the respondents, respectively. An orb-weaver spider was selected by 2.6%, and a louse by 2.8%. Only 38.9% of the respondents were convinced that LB is curable, while 39.4% claimed that it is not, and 21.6% responded “I do not know”. Although the majority of the respondents (87.5%) know that LB is transmitted by tick bites, 12.5% are convinced that other means of transmission are possible, such as breastfeeding or drinking unpasteurized milk (Figure 1A). The majority of the respondents properly indicated common symptoms of LB such as arthritis (84.2%), headaches (70.9%), erythema migrans (58.9%), and nerve paresis (20.4%), but there were answers such as autism (2.5%) and hair loss (5.2%) (Figure 1B). A vast majority of the respondents (91.9%) correctly responded that antibiotics are the treatment for LB. However, 40.6% of the respondents selected alternative treatment for LB as well (Figure 1C).

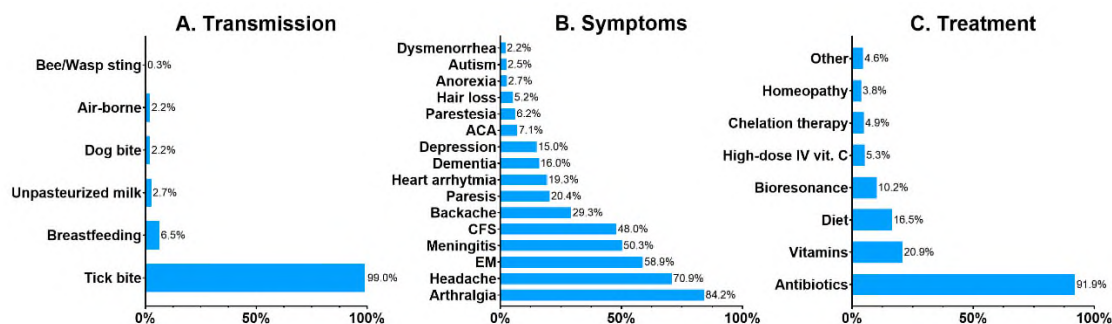


Figure 1. Respondents' beliefs about the transmission (A), symptoms (B) and treatment (C) of Lyme borreliosis. Data presented as percentages. Abbreviations: ACA, acrodermatitis chronica atrophicans; CFS, chronic fatigue syndrome; EM, erythema migrans; IV, intravenous.

3.3. Attitude

Using the 10-point Likert scale, the respondents classified cancer as a major contributor to disease burden (median 10, IQR 9–10). Cardiovascular disease (CVD) was ranked second (median 9, IQR 8–10), and TBDs—third (median 8, IQR 6–9) (Figure 2). The differences were statistically significant with $p < 0.001$ in one-way mixed-effects ANOVA and Tukey's multiple comparisons post hoc test. Interestingly, TBDs were rated equal to or higher than cancer and CVD by 39% and 46% of the respondents, respectively. Overall, 50% of the respondents rated TBDs as equal to or more significant than cancer or CVD. Respondents rating TBDs at least equally high to cancer or CVD did not differ in terms of age, sex, place of residence, exposure to ticks, tick bite history, and GKS scores. There was a difference in education levels. Having a university diploma was associated with perception of a lower disease burden attributed to TBDs (42.6% with university diploma and 62.6% without it ranked TBDs as at least equal to cancer and CVD; chi-square statistic 13.96; $p < 0.001$).

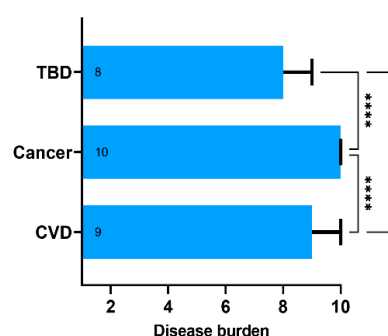


Figure 2. The subjective disease burden assessed using the 10-point Likert scale ranging from 1—“does not affect the human health” to 10—“poses significant public health burden”. Data presented as medians (boxes) and interquartile range (whiskers). The annotations within the bars represent the median values. **** represent p -value below 0.001 calculated with the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Abbreviations: TBD, tick-borne diseases; CVD, cardiovascular diseases.

After a tick bite, 50% of surveyed individuals remove the tick by themselves, 47% wanted to have the tick removed by a healthcare professional, 2% want to do both, and only 1% want to deter the tick by covering it with oil or butter. A total of 69% answered that they would like to test the removed tick for pathogens. In addition, a total of 88.3% of the respondents were convinced that mouthparts remaining in the skin after tick removal pose a significant health danger (7 points or more in the 10-point Likert scale). The median result was 10 (IQR 8–10). Surveyed individuals who attributed lower risk to tick fragments in the skin were also more likely to remove a tick by themselves, without consultation with a healthcare professional (OR, 2.67; 95% CI, 1.19–5.97; $p = 0.018$). Only 14.7% of respondents believe that post-exposure prophylaxis with antibiotics should always be administered after a tick bite, and 33.8% admit that they “do not know”. Post-exposure prophylaxis with an antibiotic was not commonly used after tick bites. Out of those bitten by a tick in the past, only 19 (12%) respondents and 10 (8%) of respondents' children received a prophylaxis with an antibiotic after a tick bite.

We also asked the respondents to assess their own knowledge about TBDs and the principles of their prevention. As assessed with the 10-point Likert score, respondents feel moderately knowledgeable with regard to general knowledge about TBDs (median 5, IQR 4–6) and knowledge about tick bite prophylaxis (median 6, IQR 5–8). Thirty-six percent of the respondents feel confident about the prophylaxis and TBDs (score 7 or higher). These respondents tended to score higher results in GKS (OR, 2.5; 95% CI 1.5–4.1, $p < 0.001$) and also tended to assign higher disease burden scores to TBD, in relation to CVD and cancer (OR 1.7, 95% CI 1.1–2.8, $p = 0.02$).

3.4. Practice

The median TPS was 63.6% (IQR, 54.5%; 72.7%). Respondents with TPS below 25th percentile (50% points or less out of 11) were categorized as having poor knowledge of tick bite protection. Low TPS received 18.7% of the respondents. In the multivariate model, poor tick bite protection was associated with the male sex (OR 2.36, 95% CI 1.10–5.09, $p = 0.028$) and lower education levels (OR, 2.48; 95% CI, 1.30–4.73; $p = 0.006$). On the contrary, respondents whose child was bitten by a tick were less likely to score low TPS (OR 0.21, 95% CI 0.09–0.50, $p < 0.001$). Place of residence, and spending time in outdoor green spaces were not associated with tick protection practices.

Surveyed individuals with high TPS scored high GKS more often, indicating a connection between knowledge and good preventive practices in a univariate model (OR, 1.90; 95% CI, 1.12–3.25; $p = 0.02$). However, when the history of tick bites, exposure to ticks in green areas and other confounders were included in the multivariate model, high GKS was no longer a predictor of proper preventive practices expressed as high TPS.

The respondents recognized that post-exposure inspection of the body after returning from green areas and using appropriate clothing and washing clothes were more important methods of prophylaxis than the use of repellents on the body or clothing (Figure 3A). The use of oral supplements and electronic repellants, which are considered substantially less effective in tick protection compared to the other methods, was not preferred by the respondents. Only 61% (248/406) of the respondents purchased a repellent in the last year, and when choosing a product, 77% (304/394) of them were persuaded by its natural composition (Figure 3B). Based on these responses, we calculated an additional index regarding use of repellents. As mentioned before, individuals with high GKS were less likely to have a poor repellent practice (OR, 0.58; 95% CI, 0.36–0.94).

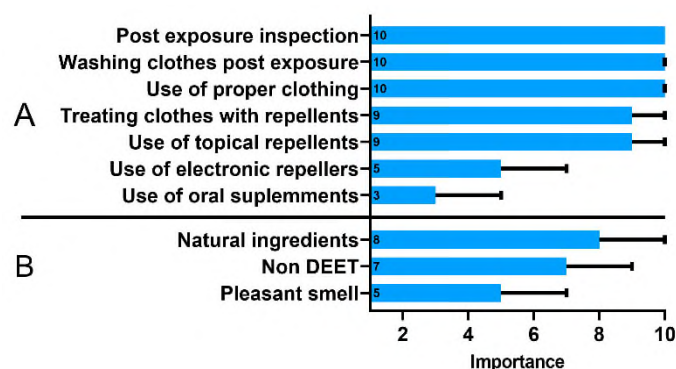


Figure 3. The importance of tick protection methods (A) and characteristics of a tick repellent (B) assessed using the 10-point Likert scale ranging from 1—“of little importance” to 10—“highly important”. Data presented as medians (boxes) and interquartile range (whiskers). The annotations within the bars represent the median values.

The attitude of the respondents to TBE vaccination was also assessed. A positive attitude towards TBD vaccine (modeled as receiving a TBE vaccine in the past, vaccinating a child with the TBE vaccine in the past, or an intention to receive this vaccine or to vaccinate a respondent’s child in the future) was observed in 48.0% (191/398) and was more common in respondents with a recent tick bite (OR 2.10, 1.07–4.10, $p = 0.030$), in respondents whose child was bitten by a tick (OR, 1.69; 95% CI, 1.00–2.83, $p = 0.049$), and in respondents who relied on verified sources of information (OR, 2.654, 1.66–4.23; $p < 0.001$).

4. Discussion

Our findings demonstrated that inhabitants of northeastern Poland, where TBDs are endemic have moderate knowledge about TBDs, including symptoms, transmission, treatment and prevention. Contrary to other studies [29–31], calculated scores were not particularly low in our study, despite the fact that we surveyed general population, and

not professionals working in green areas, who are usually better informed about TBDs. However, we identified multiple gaps in knowledge and misconceptions regarding TBDs, which might pose a real health risk.

Almost a quarter of the surveyed individuals incorrectly indicated a tick in an illustration. Additionally, the majority of respondents believed that leaving a tick fragment in the skin is associated with a high health risk, which in turn was associated with the desire to have the tick removed by a healthcare professional. Seeking medical advice, whether in emergency care or general practice, extends the time the ticks remain in the skin, which increases the risk of LB infection [32].

Alongside antibiotics, almost half of the study participants chose other non-verified treatment options for LB. This possibly reflects a false belief, that LB patients often experience many persistent symptoms after infection with *Borrelia burgdorferi*, and as a result require additional treatment. Accordingly, a minority of respondents in this study were convinced that LB is a curable disease. It is not surprising then that the respondents perceived TBDs as almost as dangerous as CVD and cancer. It was shown previously that patients with chronic LB have significantly impaired quality of life and greater healthcare utilization compared to the general population and patients with other chronic diseases [33]. However, persistent symptoms are reported in a relatively small subset of treated LB patients [32].

The increasing problem with ticks and LB triggered efforts to develop vaccines protecting from infections with *Borrelia burgdorferi*. Currently, while awaiting a widely accepted vaccine against LB, the only method of protection against LB is avoiding tick bites through the use of appropriate personal protection measures [34,35]. There is no single best measure to protect from tick bites. A combination of two or more actions, such as wearing light-colored clothing that cover legs and arms, changing clothes worn outdoors, checking body for ticks and removing them promptly, and applying tick repellents on skin and clothes provides the best protection against tick bites [36]. Not surprisingly, good tick protection practices were more common in individuals whose child was bitten by a tick. Increased risk perceptions are associated with adoption of behaviors reducing tick bites, what was demonstrated in multiple previous studies [36]. In this study the use of tick repellents on the body or clothing was considered less important than other personal protection measures to prevent tick bites. Similar results were obtained in the Netherlands and the USA. These studies showed that respondents preferred wearing appropriate clothing, body checking and prompt tick removing over the use repellants on clothing or skin [28,29,37]. In addition, our study showed that although the respondents live in an endemic area with high tick activity, only 61% of them bought a repellent in the last year, and when choosing a product, 77% were persuaded by its natural composition and lack of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET). Research has shown that respondents are reluctant to use repellants, which may be related to the commonly known side effects of using DEET [38]. Respondents mistakenly choose natural repellants, not knowing that their deterrent effect is uncertain. Moreover, such a choice may be dictated by the ignorance of the proper use of DEET preparations, as discussed by the Center for Disease Control and Prevention (CDC) and the Environmental Protection Agency, with detailed recommendations for use in children [38].

Prophylaxis with a single or multiple doses of doxycycline to prevent Lyme disease after a tick bite remains controversial. Using antibiotic prophylaxis might be advantageous, but further confirmation is needed [39]. According to the guidelines, post-exposure prophylaxis should be considered in individual cases, taking into account multiple tick bites during a stay in an LB endemic area [40].

Respondents of our study rarely receive antibiotics after a tick bite and are not convinced that antibiotic prophylaxis should always be used after being bitten by a tick. They commonly, however, wanted to seek medical advice either to have the tick removed from the skin or to test it for infections. Therefore, health care professionals play an important role in communicating proper tick bite management. In the previous study conducted in the USA, assessing the knowledge and challenges in the diagnosis and treatment of TBDs among doctors, it was found that emergency care and emergency medicine specialists

prescribe treatment incompatible with the guidelines for the prevention of tick bites [41], and healthcare providers from areas with low incidence of LB in the USA too often use post-exposure prophylaxis in the form of antibiotic therapy [42]. Moreover, clinicians from the United States complained about difficulties in communicating with patients, resulting from the patients' misconceptions derived from sources other than guideline-based resources and evidence [41].

Our study showed that the acceptance of the TBE vaccine is low in general population. A positive attitude towards this vaccine was more common in respondents with a recent tick bite, what may be associated with a higher risk perception of TBDs. Other studies also show that people at risk of the disease most often express the willingness to be vaccinated [43,44]. Therefore, communicating risks of LB might increase the public acceptance of the future LB vaccine. In one study assessing tick-related KAP among people living in the endemic areas of Connecticut and Maryland, the respondents were asked about preventive behaviors for LB, including a desire to receive a vaccine against LB if one was available. Eighty-four percent of the respondents declared that they were moderately (35%) or very (49%) willing to accept the LB vaccine, but they claimed that body checking and bathing after coming from green areas is more important [26]. A recent survey conducted in the USA showed that willingness to receive a Lyme disease vaccine was high [45]. The results of our research, as well as the data from the literature, suggest that as the work on the development of vaccines progresses, further research is needed to determine the causes of negative attitudes towards vaccination in part of the population living in endemic areas. This will allow for the preparation of optimal educational activities promoting vaccination against both TBE and LB, if a vaccine for the latter is registered and approved for use.

Previous studies on TBD knowledge, attitude and practice have produced mixed results. Some of them showed that the society is well educated in the field of TBD threats [46], while others, just like in our study, showed that the knowledge in this area is insufficient [30,47]. We should acknowledge several limitations of our study. Firstly, it should be noted that women are overrepresented in this study, thus our results should not be generalized to the entire population. Secondly, correlations we calculated do not necessarily mean causation, as there might be other undiscovered factors that have an impact on preventive behaviors and attitudes. However, knowledge gaps we identified and associations we found might be addressed in future educational campaigns. Previously it was shown that recognizing the gaps in knowledge may be helpful in planning an appropriate educational program, raising awareness of LB and tick bite prevention among the general population. A study conducted in France in 2016–2019 showed that the implementation of a national plan against tick-borne infections resulted in a greater proportion of the population applying protective measures against tick bites and tick-borne diseases [24].

5. Conclusions

The respondents living in the endemic region of northeastern Poland with high tick activity consider TBDs a significant threat to the health of themselves and their families. People who have been bitten by a tick personally or whose children have experienced it know the most about TBDs. Gaps in knowledge and misconceptions regarding the prevention of LB require the implementation of educational activities. Additionally, understanding gaps in knowledge and practice will allow for proper planning of educational activities, which could contribute to inhibiting the increase in the incidence of LB, in anticipation of an effective and socially acceptable vaccine.

Modification of educational activities should take into account the use of the mass media and the Internet, which are currently the main information channels for the respondents. The information campaign should also include facts about TBD immunoprophylaxis with both the registered TBE vaccine and the future LB vaccine.

Author Contributions: Conceptualization, K.T. and A.S.; Data curation, M.W., D.L. and E.B.; Formal analysis, K.T.; Methodology, M.W. and K.T.; Project administration, A.S.; Supervision, A.S.; Visualization, K.T.; Writing—original draft, M.W.; Writing—review and editing, K.T. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Medical University of Białystok, Poland (grant no. SUB/1/DN/22/001/1148).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of Medical University of Białystok (approval numbers R-I-002/489/2019).

Informed Consent Statement: Oral consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References




- Daniel, M.; Danielová, V.; Kříž, B.; Jirsa, A.; Nožička, J. Shift of the Tick *Ixodes Ricinus* and Tick-Borne Encephalitis to Higher Altitudes in Central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *22*, 327–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hellenbrand, W.; Kreusch, T.; Böhmer, M.M.; Wagner-Wiening, C.; Dobler, G.; Wichmann, O.; Altmann, D. Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Germany, 2001–2018. *Pathogens* **2019**, *8*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Riccardi, N.; Antonello, R.M.; Luzzati, R.; Zajkowska, J.; Di Bella, S.; Giacobbe, D.R. Tick-Borne Encephalitis in Europe: A Brief Update on Epidemiology, Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Eur. J. Intern. Med.* **2019**, *62*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rudenko, N.; Golovchenko, M.; Grubhoffer, L.; Oliver, J.H. Updates on *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex with Respect to Public Health. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2011**, *2*, 123–128. [[CrossRef](#)]
- Hofmann, H.; Fingerle, V.; Hunfeld, K.-P.; Huppertz, H.-I.; Krause, A.; Rauer, S.; Ruf, B. Cutaneous Lyme Borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *GMS Ger. Med. Sci.* **2017**, *15*, Doc14. [[CrossRef](#)]
- Cardenas-de la Garza, J.A.; De la Cruz-Valadez, E.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O. Clinical Spectrum of Lyme Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 201–208. [[CrossRef](#)]
- Stanek, G.; Wormser, G.P.; Gray, J.; Strle, F. Lyme Borreliosis. *Lancet* **2012**, *379*, 461–473. [[CrossRef](#)]
- Asbrink, E.; Hovmark, A. Comments on the Course and Classification of Lyme Borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **1991**, *77*, 41–43.
- Hauser, U.; Krahl, H.; Peters, H.; Fingerle, V.; Wilske, B. Impact of Strain Heterogeneity on Lyme Disease Serology in Europe: Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using Different Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 427–436. [[CrossRef](#)]
- Wozińska-Klepadło, M.; Toczyłowski, K.; Sulik, A. Challenges and New Methods in the Diagnosis of Lyme Disease in Children. *Przegl. Epidemiol.* **2020**, *74*, 652–661. [[CrossRef](#)]
- Brorson, O.; Brorson, S.H. An In Vitro Study of the Susceptibility of Mobile and Cystic Forms of *Borrelia burgdorferi* to Metronidazole. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **1999**, *107*, 566–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gilbert, L. The Impacts of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Disease Risk. *Annu. Rev. Entomol.* **2021**, *66*, 373–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steere, A.C.; Coburn, J.; Glickstein, L. The Emergence of Lyme Disease. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 1093–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bulletins, Reports, Epidemiological Information—National Institute of Public Health. Available online: http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (accessed on 26 September 2022).
- McCormick, D.W.; Kugeler, K.J.; Marx, G.E.; Jayanthi, P.; Dietz, S.; Mead, P.; Hinckley, A.F. Effects of COVID-19 Pandemic on Reported Lyme Disease, United States, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 2715–2717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Amicizia, D.; Domnich, A.; Panatto, D.; Lai, P.L.; Cristina, M.L.; Avio, U.; Gasparini, R. Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Europe and Its Prevention by Available Vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 1163–1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gomes-Solecki, M.; Arnaboldi, P.M.; Backenson, P.B.; Benach, J.L.; Cooper, C.L.; Dattwyler, R.J.; Diuk-Wasser, M.; Fikrig, E.; Hovius, J.W.; Laegreid, W.; et al. Protective Immunity and New Vaccines for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2019**, *70*, 1768–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Plotkin, S.A. Lemons and Lyme. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **2018**, *7*, 267–269. [[CrossRef](#)]
- Nigrovic, L.E.; Neville, D.N.; Balamuth, F.; Bennett, J.E.; Levas, M.N.; Garro, A.C. Pedi Lyme Net A Minority of Children Diagnosed with Lyme Disease Recall a Preceding Tick Bite. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 694–696. [[CrossRef](#)]
- Valneva Completes Recruitment for Phase 2 Studies of Its Lyme Disease Vaccine Candidate VLA15—Valneva. Available online: <https://valneva.com/press-release/valneva-completes-recruitment-for-phase-2-studies-of-its-lyme-disease-vaccine-candidate-vla15/> (accessed on 26 September 2022).

21. Tsao, J.I.; Wootton, J.T.; Bunikis, J.; Luna, M.G.; Fish, D.; Barbour, A.G. An Ecological Approach to Preventing Human Infection: Vaccinating Wild Mouse Reservoirs Intervenes in the Lyme Disease Cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 18159–18164. [[CrossRef](#)]
22. Sajid, A.; Matias, J.; Arora, G.; Kurokawa, C.; DePonte, K.; Tang, X.; Lynn, G.; Wu, M.-J.; Pal, U.; Strank, N.O.; et al. mRNA Vaccination Induces Tick Resistance and Prevents Transmission of the Lyme Disease Agent. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabj9827. [[CrossRef](#)]
23. Schwartz, A.M.; Mackeprang, J.M.; Mead, P.S.; Hinckley, A.F. Effectiveness of Personal Protection Measures against Lyme Disease: A Review of Epidemiologic Studies from the United States. *Zoonoses Public Health* **2022**, *69*, 777–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Septfons, A.; Figoni, J.; Gautier, A.; Soullier, N.; de Valk, H.; Desenclos, J.-C. Increased Awareness and Knowledge of Lyme Borreliosis and Tick Bite Prevention among the General Population in France: 2016 and 2019 Health Barometer Survey. *BMC Public Health* **2021**, *21*, 1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Howard, K.; Beck, A.; Kaufman, A.; Rutz, H.; Hutson, J.; Crum, D.; Rowe, A.; Marx, G.; Hinckley, A.; White, J. Assessment of Knowledge, Attitudes, and Practices Toward Ticks and Tickborne Disease among Healthcare Professionals Working in Schools in New York and Maryland. *J. Sch. Nurs. Off. Publ. Natl. Assoc. Sch. Nurses* **2022**, 10598405221099484. [[CrossRef](#)]
26. Beck, A.; Bjork, J.; Biggerstaff, B.J.; Eisen, L.; Eisen, R.; Foster, E.; Signs, K.; Tsao, J.I.; Kough, E.; Peterson, M.; et al. Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Tick-Borne Disease Prevention in Lyme Disease-Endemic Areas of the Upper Midwest, United States. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2022**, *13*, 101925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Crist, S.D.; Kopsco, H.; Miller, A.; Gronemeyer, P.; Mateus-Pinilla, N.; Smith, R.L. Knowledge, Attitudes, and Practices of Veterinary Professionals towards Ticks and Tick-Borne Diseases in Illinois. *One Health* **2022**, *14*, 100391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Schotthoefer, A.; Stinebaugh, K.; Martin, M.; Munoz-Zanzi, C. Tickborne Disease Awareness and Protective Practices among U.S. Forest Service Employees from the Upper Midwest, USA. *BMC Public Health* **2020**, *20*, 1575. [[CrossRef](#)]
29. Niesobecki, S.; Hansen, A.; Rutz, H.; Mehta, S.; Feldman, K.; Meek, J.; Niccolai, L.; Hook, S.; Hinckley, A. Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Tick-Borne Disease Prevention in Endemic Areas. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 101264. [[CrossRef](#)]
30. Gupta, S.; Eggers, P.; Arana, A.; Kresse, B.; Rios, K.; Brown, L.; Sampson, L.; Kploanyi, M. Knowledge and Preventive Behaviors towards Tick-Borne Diseases in Delaware. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2018**, *9*, 615–622. [[CrossRef](#)]
31. Riccò, M.; Bragazzi, N.L.; Vezzosi, L.; Balzarini, F.; Colucci, M.E.; Veronesi, L. Knowledge, Attitudes, and Practices on Tick-Borne Human Diseases and Tick-Borne Encephalitis Vaccine among Farmers from North-Eastern Italy (2017). *J. Agromed.* **2020**, *25*, 73–85. [[CrossRef](#)]
32. Ursinus, J.; Vrijmoeth, H.D.; Harms, M.G.; Tulen, A.D.; Knoop, H.; Gauw, S.A.; Zomer, T.P.; Wong, A.; Friesema, I.H.M.; Vermeeren, Y.M.; et al. Prevalence of Persistent Symptoms after Treatment for Lyme Borreliosis: A Prospective Observational Cohort Study. *Lancet Reg. Health Eur.* **2021**, *6*, 100142. [[CrossRef](#)]
33. Johnson, L.; Wilcox, S.; Mankoff, J.; Stricker, R.B. Severity of Chronic Lyme Disease Compared to Other Chronic Conditions: A Quality of Life Survey. *PeerJ* **2014**, *2*, e322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nau, R.; Christen, H.-J.; Eiffert, H. Lyme Disease—Current State of Knowledge. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **2009**, *106*, 72–81. [[CrossRef](#)]
35. Gould, L.H.; Nelson, R.S.; Griffith, K.S.; Hayes, E.B.; Piesman, J.; Mead, P.S.; Cartter, M.L. Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Disease Prevention among Connecticut Residents, 1999–2004. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **2008**, *8*, 769–776. [[CrossRef](#)]
36. Eisen, L. Personal Protection Measures to Prevent Tick Bites in the United States: Knowledge Gaps, Challenges, and Opportunities. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2022**, *13*, 101944. [[CrossRef](#)]
37. Beaujean, D.J.M.A.; Bults, M.; van Steenberghe, J.E.; Voeten, H.A.C.M. Study on Public Perceptions and Protective Behaviors Regarding Lyme Disease among the General Public in the Netherlands: Implications for Prevention Programs. *BMC Public Health* **2013**, *13*, 225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. ATSDR—ToxFAQsTM: DEET (N,N-Diethyl-Meta-Toluamide). Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=1035&tid=201> (accessed on 21 January 2020).
39. Zhou, G.; Xu, X.; Zhang, Y.; Yue, P.; Luo, S.; Fan, Y.; Chen, J.; Liu, M.; Dong, Y.; Li, B.; et al. Antibiotic Prophylaxis for Prevention against Lyme Disease Following Tick Bite: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Flisiak, R.; Pancewicz, S.; Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. Diagnostics and treatment of Lyme borreliosis. Recommendations of Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl. Epidemiol.* **2008**, *62*, 193–199. [[PubMed](#)]
41. Mattoon, S.; Baumhart, C.; Barsallo Cochez, A.C.; MacQueen, D.; Snedeker, J.; Yancey, C.B.; Gatch, M.; Mader, E.M. Primary Care Clinical Provider Knowledge and Experiences in the Diagnosis and Treatment of Tick-Borne Illness: A Qualitative Assessment from a Lyme Disease Endemic Community. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 894. [[CrossRef](#)]
42. Brett, M.E.; Hinckley, A.F.; Zielinski-Gutierrez, E.C.; Mead, P.S. U.S. Healthcare Providers’ Experience with Lyme and Other Tick-Borne Diseases. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2014**, *5*, 404–408. [[CrossRef](#)]
43. Renner, B.; Reuter, T. Predicting Vaccination Using Numerical and Affective Risk Perceptions: The Case of A/H1N1 Influenza. *Vaccine* **2012**, *30*, 7019–7026. [[CrossRef](#)]
44. Schmid, P.; Rauber, D.; Betsch, C.; Lidolt, G.; Denker, M.-L. Barriers of Influenza Vaccination Intention and Behavior—A Systematic Review of Influenza Vaccine Hesitancy, 2005–2016. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Hook, S.A.; Hansen, A.P.; Niesobecki, S.A.; Meek, J.I.; Bjork, J.K.H.; Kough, E.M.; Peterson, M.S.; Schiffman, E.K.; Rutz, H.J.; Rowe, A.J.; et al. Evaluating Public Acceptability of a Potential Lyme Disease Vaccine Using a Population-Based, Cross-Sectional Survey in High Incidence Areas of the United States. *Vaccine* **2022**, *40*, 298–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Phillips, C.B.; Liang, M.H.; Sangha, O.; Wright, E.A.; Fossel, A.H.; Lew, R.A.; Fossel, K.K.; Shadick, N.A. Lyme Disease and Preventive Behaviors in Residents of Nantucket Island, Massachusetts. *Am. J. Prev. Med.* **2001**, *20*, 219–224. [[CrossRef](#)]
47. Hook, S.A.; Nelson, C.A.; Mead, P.S. U.S. Public's Experience with Ticks and Tick-Borne Diseases: Results from National HealthStyles Surveys. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2015**, *6*, 483–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Diagnostic Precision in Lyme borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort

Marta Wozinska ¹, Kacper Toczyłowski ¹ , Dawid Lewandowski ¹, Ewa Bojkiewicz ¹, Robert Milewski ² 
and Artur Sulik ^{1,*} 

¹ Department of Pediatric Infectious Diseases, Medical University of Białystok, 15-274 Białystok, Poland; kacper.toczyłowski@umb.edu.pl (K.T.)

² Department of Biostatistics and Medical Informatics, Medical University of Białystok, 15-295 Białystok, Poland; robert.milewski@umb.edu.pl

* Correspondence: artur.sulik@umb.edu.pl; Tel.: +48-847450685

Abstract: (1) Background: Lyme borreliosis (LB) is a tick-borne disease known for its diagnostic challenges. Conventional two-tiered testing (CTTT) for antibodies is time-consuming, has low sensitivity in the early stages of disease, and sometimes generates false-positive IgM immunoblots. To tackle this issue, modified two-tiered testing (MTTT) was introduced, incorporating recombinant VlsE and C6 antigens to enhance diagnostic accuracy. (2) Methods: In this prospective study, we enrolled children exhibiting symptoms indicative of LB. We collected serum samples at various intervals and subjected them to analysis using standard enzyme immunoassays. We then compared these results with the outcomes from the VlsE and C6 assays. (3) Results: In our study, all 33 patients displaying erythema migrans (EM), a characteristic symptom of LB, exhibited positive responses to the C6 antigen. This finding underscores the potential utility of the C6 antigen as a reliable diagnostic tool for LB. Additionally, we observed a significant reduction in anti-VlsE antibody levels following antibiotic treatment in EM patients. (4) Conclusions: The utilization of recombinant VlsE and C6 antigens in LB diagnostics and monitoring has yielded promising results. Nonetheless, it is imperative for clinicians to exercise caution and interpret results in conjunction with clinical findings, considering the dynamic nature of medical guidelines. Even with recombinant antigen tests, some children with EM tested negative, highlighting the importance of clinical diagnosis for treatment decisions. Furthermore, clinicians should be mindful of the possibility of persistently positive VlsE/C6 test results during LB treatment monitoring.

Keywords: Lyme borreliosis; *Borrelia burgdorferi*; pediatric diagnosis; recombinant antigens; prevention; diagnostic precision



Citation: Wozinska, M.; Toczyłowski, K.; Lewandowski, D.; Bojkiewicz, E.; Milewski, R.; Sulik, A. Diagnostic Precision in Lyme borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort. *Diagnostics* **2023**, *13*, 3547. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13233547>

Academic Editor: Francesca Sanguedolce

Received: 31 October 2023
Revised: 14 November 2023
Accepted: 22 November 2023
Published: 28 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Lyme borreliosis (LB) is a tick-borne illness caused by the bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l) complex [1–3]. This complex includes several genospecies, such as *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s), which are prevalent in different parts of the world [3,4]. The multitude of clinical symptoms in both adults and children is related to the heterogeneity of *B. burgdorferi* [5–7].

LB is transmitted through the bite of an infected tick [8,9]. The distribution of tick bites varies between adults and children, with children being more likely to experience bites on their head and neck [8]. This poses a significant challenge because ticks can be hard to detect in these areas, especially on the scalp. Unfortunately, these areas are strongly associated with a heightened risk of Lyme neuroborreliosis (LNB) development in children [10]. Moreover, the presence of erythema migrans (EM), which is a characteristic rash associated with LB, in the hair may be overlooked [9].

Conventional two-tiered testing (CTTT) is often used to determine the level of antibodies in the blood [11]. This involves performing a first-tier tests that often utilize peptides,

recombinant proteins, or whole-cell sonicate preparations (WCS) derived from *Borrelia*, and frequently employ enzyme immunoassay (EIA) techniques, followed by a supplemental immunoblot (Western blot—WB).

The sensitivity of EIA may be lower in the early stages of the disease and may result in false-negative results during this time [12,13]. In addition, WB is a more specific test, but it can be time-consuming and expensive and has a lower sensitivity compared to EIA. It may also give false-negative results during the first weeks of infection, and its interpretation using specific criteria can be challenging [14,15]. Another disadvantage of the serological diagnosis of LB is the persistence of specific IgM and IgG antibodies, despite the use of effective treatment [16].

Due to the limitations of CTTT, modified two-tiered testing (MTTT) has been proposed. MTTT uses two different sequential EIAs without the inclusion of WB but with the use of recombinant proteins or synthetic peptides unique to *Borrelia burgdorferi*, such as the surface lipoprotein E (VlsE) antigen [17,18]. This can lead to minimal cross-reactivity with foreign antigens and can improve the specificity of the test [17,19]. Moreover, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of EIA as a confirmatory test, making immunoblots optional and incorporating enzyme immunoassays into a two-tiered testing approach [20].

The ability of *Borrelia burgdorferi* to induce illness relies heavily on its capability to avoid detection by the immune system when infecting mammals. A known strategy employed by *B. burgdorferi* to evade the immune response involves altering the antigenic properties of a protein known as the lipoprotein VlsE, which shares similarities with the variable major protein (VMP)-like sequence [21]. Among the known antigens, VlsE stands out as the sole antigen that exhibits ongoing variation of its surface epitopes. It consists of six variable regions (VRs) and six low variability invariant regions (IR) [22]. It is believed that recombination in the VRs can impede an effective response from the host immune system, leading to the development of a chronic infection and the survival of spirochetes in humans [23]. Among the six IRs of VlsE, IR₆, also known as the C6 region, is commonly targeted by the antibody response in infected individuals [24]. The detection of anti-C6 antibodies may be helpful in the serologic diagnosis of LB in humans [25–27]. Studies report that tests utilizing the VlsE and C6 peptides show higher sensitivity compared to CTTT [25,28]. Moreover, anti-VlsE and anti-C6 antibodies exhibit a dynamic response to infection, swiftly appearing in the patient's serum shortly after infection, and typically diminishing following successful treatment [29,30].

Although the utilization of highly specific antigens in the diagnosis and treatment monitoring of LB in adults has shown promise [31], there remains a notable gap in the available data regarding the application of these antigens within the pediatric population. In light of Poland being endemic to LB and considering the unique aspects of LB in children, it is of paramount importance to conduct comprehensive studies tailored to this specific demographic. Our study thus aims to address this gap by assessing the diagnostic and treatment monitoring potential of VlsE and C6 tests in early-stage LB within the pediatric population, focusing on erythema migrans and neuroborreliosis. Furthermore, we aim to investigate whether children initially diagnosed with erythema migrans by family doctors, who are later referred to specialists in infectious diseases, exhibit positive antibody responses. This aspect of our study not only contributes to understanding the effectiveness of these serologic assays but also sheds light on the diagnostic outcomes for children who initially seek care from general practitioners.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Setting

In this prospective study, we recruited children who displayed symptoms suggestive of Lyme borreliosis. The study included children under 19 years of age, and enrollment took place between October 2019 and September 2022. The Medical University of Białystok Children's Clinical Hospital, Poland, served as the study setting, providing a suitable

environment for the evaluation and management of pediatric cases. We aimed to collect serum samples at the time of consultation and then 3, 6, and 12 months later to monitor the treatment of LB.

Only children with symptoms of early LB, i.e., EM and Lyme neuroborreliosis (LNB), were included. The diagnosis of EM in the enrolled children followed the gold standard criteria established for EM diagnosis. The characteristic EM lesions observed exhibited a round, erythematous appearance and could present with warmth and rare instances of pain or itchiness. These lesions gradually expanded over several days, often exceeding 5 cm in diameter. In some cases, central clearing occurred as the rash enlarged, occasionally resulting in a bull's-eye pattern. These defined criteria were crucial in ensuring accurate and consistent identification of EM cases among the study participants [32–35]. The history of a skin lesion meeting the criteria for EM diagnosis, along with the description provided by the parents or a photograph of the skin lesion, was used to confirm the presence of EM in these children. This approach ensured that the diagnosis of EM is consistent and accurate based on the established standards.

The diagnosis of LNB was made according to the Polish Society of Infectious Diseases 2015 guidelines [36]. The following criteria were used: (I) neurological symptoms suggestive of LNB (with other causes excluded), (II) CSF pleocytosis, and (III) specific antibodies in the CSF (produced intrathecally). Patients with positive serology, but other manifestations of LB and non-specific symptoms such as fatigue, headaches, muscle pain, and recurrent fevers were excluded from the study.

2.2. Assays

Standard LB EIAs were carried out in the Department of Pediatric Laboratory Diagnostics of the recruiting setting. *Borrelia* IgM and IgG ELISA Recombinant Antigen assays were used (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Divischgasse, Wien, Austria). In the IgM class, p21 OspC (*B. afzelii*), p21 OspC (*B. garinii*), p41/1 (*B. bavariensis*), and VlsE (fusion protein of different *Borrelia* genospecies) were used. In the IgG class, p21 OspC antigens (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*), p18 (*B. afzelii*), p100 (*B. afzelii*), and VlsE (fusion protein of different *Borrelia* genospecies) were used. The results were interpreted according to the manufacturer's instructions and cut-off points: ≥ 11 Biomedica *Borrelia* units (BBU)/mL (positive), 6 to 11 BBU/mL (equivocal), and < 6 BBU/mL (negative).

Standard LB EIAs were compared with the Immunetics C6 Lyme ELISA Kit (Immunetics, Norwood, MA, USA), with them detecting both IgM and IgG antibodies. The results were interpreted according to the manufacturer's instructions and cut-off points: ≥ 1.1 Lyme Index LI (positive), 0.91 to 1.09 (LI) (equivocal), and ≤ 0.9 LI (negative). The specific anti-VlsE antibodies were detected using anti-*B. burgdorferi* VlsE ELISA IgG assays (Euroimmun, Seekamp, Luebeck, Germany), according to the instructions provided by the manufacturer. The results were interpreted according to the manufacturer's instructions and cut-off points: ≥ 22 relative units (RU)/mL (positive), 16 to 22 RU/mL (equivocal), and ≤ 16 RU/mL (negative).

2.3. Statistical Analysis

First, we assessed the percent agreement between the standard EIA and EIA with the C6 antigen results. Next, using the Jonckheere–Terpstra test, we performed a trend analysis for the decline in anti-VlsE antibodies after appropriate treatment at 3-, 6-, and 12-month intervals. All analyses were carried out using TIBCO Software Inc. (2017) Statistica, version 13 (Palo Alto, CA, USA), GraphPad Prism version 9.4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and R Project version 4.2.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Basel, Switzerland).

2.4. Ethical Considerations

This research was carried out with the consent of the Bioethics Committee of the Medical University of Bialystok (approval number R-I-002/489/2019).

3. Results

3.1. Patient Characteristics

A total of 354 children were screened for study inclusion. Two-hundred and eighty four patients were excluded from the analysis because of: unconfirmed LB ($n = 108$), nonspecific symptoms ($n = 106$), missing clinical information ($n = 24$), and a lack of follow-up examinations ($n = 39$). Furthermore, we excluded five Lyme arthritis and two Lyme carditis patients from our study due to their small numbers and the fact that they were unable to return for follow-up at 3, 6, or 12 months because of the COVID-19 pandemic.

After applying the exclusion criteria, a total of 70 children were included in the analysis: 49 children diagnosed with EM and 21 children diagnosed with LNB. The median age of the patients was 8 years, and 43 (61%) of them were female. The age range of the patients varied from a minimum of 12 months (1 year) to a maximum of 18 years.

All of the EM cases were clinically diagnosed according to the guidelines. Children diagnosed with LNB were hospitalized due to symptoms such as meningitis and/or facial nerve palsy. Among these cases, six children exhibited isolated facial nerve palsy, five had lymphocytic meningitis along with facial nerve palsy, and ten children presented with meningitis without facial nerve involvement. For the majority, these symptoms developed within a week before their hospitalization. Remarkably, six children diagnosed with LNB (29%) were admitted to the hospital one month after the initial onset of neuroborreliosis symptoms. Importantly, all LNB patients tested positive for specific anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in both enzyme immunoassays and confirmatory Western blotting.

Unfortunately, our ability to comprehensively assess the diagnostic efficacy of the EIA test with C6 in the entire study group was hindered due to the discontinuation of C6 test production by the manufacturer. Consequently, 16 patients with erythema migrans (EM) and 6 with Lyme neuroborreliosis (LNB) were not tested with the C6 antigen.

Despite the unavailability of the C6 test, we successfully identified the presence of anti-C6 antibodies in a subgroup of 48 children, which included 33 with EM (Table 1) and 15 with LNB (Table 2). The LNB subgroup consisted of four children with facial nerve palsy along with meningitis, five with facial nerve palsy but without meningitis, and six patients with meningitis only.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of children with erythema migrans undergoing C6 and VLsE Lyme ELISA testing.

Patient Number	Age (Years)	Sex	Treatment	Treatment Duration (Days)	Lyme IgG EIA (BBU/mL)	Lyme IgM EIA (BBU/mL)	VLsE (RU/mL)	C6 Lyme ELISA (LI)
1.	9	F	AMX	21	13.1	16.4	20.5	16.1
2.	5	F	AMX	21	11.3	24.1	15.6	13.7
3.	7	F	AMX	14	57.9	4.1	178.0	11.8
4.	15	F	DOX	21	1.8	21.3	4.2	1.6
5.	5	M	AMX	21	10.6	40.2	33.1	100.0
6.	8	M	AMX	21	15.6	41.4	49.1	100.0
7.	12	F	AMX	21	14.7	8.3	74.4	13.6
8.	8	F	AMX	21	4.3	17.5	11.1	15.1

Table 1. Cont.

Patient Number	Age (Years)	Sex	Treatment	Treatment Duration (Days)	Lyme IgG EIA (BBU/mL)	Lyme IgM EIA (BBU/mL)	VIsE (RU/mL)	C6 Lyme ELISA (LI)
9.	9	F	AMX	21	35.0	20.7	235.0	100.0
10.	3	M	AMX	21	19.6	2.8	49.5	5.7
11.	7	F	AMX	21	11.4	5.6	42.8	12.9
12.	6	F	AMX	21	14.7	38.6	18.6	11.4
13.	4	M	AMX	21	54.8	54.4	250.0	100.0
14.	4	F	AMX	21	7.8	15.2	77.1	100.0
15.	6	M	AMX	21	15.7	11.4	106.3	100.0
16.	11	M	AMX	21	6.8	23.8	4.1	10.8
17.	17	F	AMX	21	1.3	32.1	2.4	4.8
18.	6	F	AMX	21	14.3	12.8	250.0	15.7
19.	5	F	AMX	21	4.7	14.2	11.0	17.6
20.	17	F	AMX	21	13.1	4.0	11.9	20.3
21.	10	M	AMX	21	13.6	51.4	29.5	2.4
22.	9	F	AMX	21	57.0	1.3	5.9	3.3
23.	7	M	AMX	21	3.0	15.6	8.0	9.1
24.	10	F	AMX	21	19.9	60.6	72.6	100.0
25.	3	M	AMX	21	31.9	18.0	204.9	100.0
26.	8	F	AMX	21	19.3	30.3	41.4	23.2
27.	8	F	AMX	21	18.7	60.1	50.0	13.9
28.	6	F	AMX	21	12.8	18.7	5.5	4.5
29.	3	M	CFX	14	12.4	14.7	62.5	100.0
30.	3	F	AMX	21	5.2	83.1	3.9	15.4
31.	7	M	AMX	14	19.2	16.4	15.1	20.3
32.	17	F	DOX	21	42.3	29.9	96.3	13.3
33.	6	F	AMX	28	2.9	17.3	4.6	2.2

F—female; M—male; AMX—amoxicillin; DOX—doxycycline; CFX—ceftriaxone; ELISA—enzyme-linked immunosorbent assays; ELISA ratios: >11 BBU/mL—positive result; 9–11 BBU/mL—equivocal result; <9 BBU/mL—negative result; C6 ratios: ≥ 1.10 (LI)—positive result; 0.91–1.09 (LI)—equivocal result; ≤ 0.90 (LI)—negative result; VIsE ratios: ≥ 22 (RU/mL)—positive result; 16–22 (RU/mL)—equivocal result; ≤ 16 (RU/mL)—negative result.

Notably, almost half of the children with EM who were tested with both C6 and VIsE assays were recruited approximately one month after the appearance of the skin lesion (15/33, 45%). A significant proportion of these children had already received treatment from their family doctors before study recruitment (29/33, 88%, Table 1).

Among the LNB subgroup tested with C6, 40% (6 out of 15) were hospitalized one month after the onset of neuroborreliosis symptoms, with meningitis being the most common clinical presentation. In terms of treatment, the majority of these children received a 21-day course of ceftriaxone antibiotic therapy (12/15, 80%) (Table 2).

Table 2. Demographic and clinical characteristics of children with Lyme neuroborreliosis undergoing C6 and VLsE Lyme ELISA testing.

Patient Number	Age (Years)	Sex	Clinical Presentation	Treatment	Treatment Duration (Days)	Lyme IgG EIA (BBU/mL)	Lyme IgM EIA (BBU/mL)	VLsE (RU/mL)	C6 Lyme ELISA (LI)
1.	9	F	FP	CFX	21	7.3	15.4	5.4	1.6
2.	11	M	FP	CFX	21	2.0	15.6	5.2	0.9
3.	11	F	FP	CFX	21	25.6	2.6	18.2	0.9
4.	6	M	FP	CFX	21	47.5	11.2	47.4	15.1
5.	14	F	FP	DOX	21	1.3	30.0	3.7	0.9
6.	17	M	FP + M	DOX	21	66.0	6.0	15.8	4.7
7.	10	M	FP + M	CFX	21	9.0	24	156.0	100.0
8.	15	M	FP + M	CFX	21	7.0	98.5	7.4	16.2
9.	16	F	FP + M	CFX	21	31.0	49.9	27.6	23.5
10.	13	M	M	CFX	21	2.0	200.0	1.5	9.7
11.	4	F	M	CFX	21	9.0	61.0	3.6	7.7
12.	17	F	M	CFX	21	53.4	27.2	217.0	5.6
13.	8	M	M	CFX	21	32.5	10.1	87.6	16.4
14.	15	F	M	CFX	21	3.0	23.9	46.5	100.0
15.	7	F	M	CFX	21	22.6	1.4	4.6	1.2

Abbreviations: F—female; M—male; DOX—doxycycline; CFX—ceftriaxone; ELISA—enzyme-linked immunosorbent assays; FP—facial nerve palsy; M + FP—facial nerve palsy with meningitis; M—meningitis only; ELISA ratios: >11 BBU/mL—positive result; 9–11 BBU/mL—equivocal result; <9 BBU/mL—negative result; C6 ratios: ≥ 1.10 (LI)—positive result; 0.91–1.09 (LI)—equivocal result; ≤ 0.90 (LI)—negative result; VLsE ratios: ≥ 22 (RU/mL)—positive result; 16–22 (RU/mL)—equivocal result; ≤ 16 (RU/mL)—negative result.

3.2. Evaluating the Diagnostic Efficacy of the Immunetics® C6 Lyme ELISA Assay in Pediatric Lyme Disease Diagnosis

There was no correlation between EIA IgG and C6 and between C6 and EIA IgM. C6 correlated with anti-VLsE IgG well (Spearman's $R = 0.59$, $p < 0.001$).

All 33 patients in the EM group had a positive antibody response to the C6 antigen (Table 3). Among them 27/33 (82%) had positive IgM, and 23 (70%) had positive IgG in the standard EIA assays.

A positive antibody response to the C6 antigen was observed in 12 out of 15 (80%) patients diagnosed with LNB. In these cases, positive IgM or IgG responses in the standard EIA assays were found in all 15 patients. Notably, all four (100%) children presenting with both facial nerve palsy and meningitis, as well as all six (100%) patients with meningitis alone, exhibited positive antibody responses to the C6 antigen.

However, only two out of five (40%) children with facial nerve palsy without meningitis displayed positive results in the C6 assays (Table 3). Among these three LNB patients without a positive antibody response to the C6 antigen, all had an equivocal C6 test result. All of these patients underwent a Western blot test to confirm the diagnosis of Lyme borreliosis, and all of them tested positive. This subgroup included one 11-year-old boy and two girls, aged 11 and 14.

Table 3. Percentage agreement between the Immunitics® C6 Lyme ELISA kit, Euroimmun® VIsE ELISA IgG, and standard *Borrelia* IgM and IgG enzyme immunoassays.

Results	EM n (%)	LNB n (%)
Positive anti-VIsE	25/49 (51%)	7/21(33%)
Equivocal VIsE	3/49 (6%)	1/21 (5%)
Positive anti-C6	33/33 (100%)	12/15 (80%)
Equivocal C6	0/33 (0%)	3/15 (20%)
Positive IgG EIA	30/49 (61%)	11/21 (52%)
Positive IgM EIA	40/49 (82%)	14/21 (67%)
+IgM EIA and +C6	27/33 (82%)	8/15 (53%)
+IgG EIA and +C6	23/33 (70%)	5/15 (33%)
−IgM EIA and +C6	6/33 (18%)	7/15 (47%)
−IgG EIA and +C6	10/33 (30%)	10/15 (67%)

+ indicates positive test result; − indicates negative test result. Abbreviations: C6, Immunitics® C6 Lyme ELISA; EIA, Euroimmun® VIsE ELISA IgG standard *Borrelia* enzyme immunoassay; EM, erythema migrans; LNB, Lyme neuroborreliosis.

3.3. Assessment of Anti-VIsE IgG Assays in Treatment Monitoring in Pediatric Lyme Disease

The usefulness of the anti-VIsE IgG assays in treatment monitoring was assessed in a group of 70 patients. Anti-VIsE IgG levels correlated with standard EIA IgG well (Spearman’s R = 0.72; $p < 0.001$).

A positive antibody response to the VIsE antigen was observed in 25/49 (51%) patients diagnosed with EM. Equivocal results were recorded for three (6%) patients. The median VIsE level in the EM group was 27 RU/mL (interquartile range; 8–84 RU/mL). In the EM group, we found a significant decrease in the level of anti-VIsE antibodies after antibiotic treatment after 3, 6, and 12 months from the start of therapy (Figure 1). However, this anti-VIsE antibody titer diminished by a factor of at least four, as suggested by the manufacturer to be the proof of successful treatment, in 13 (50%) patients only.

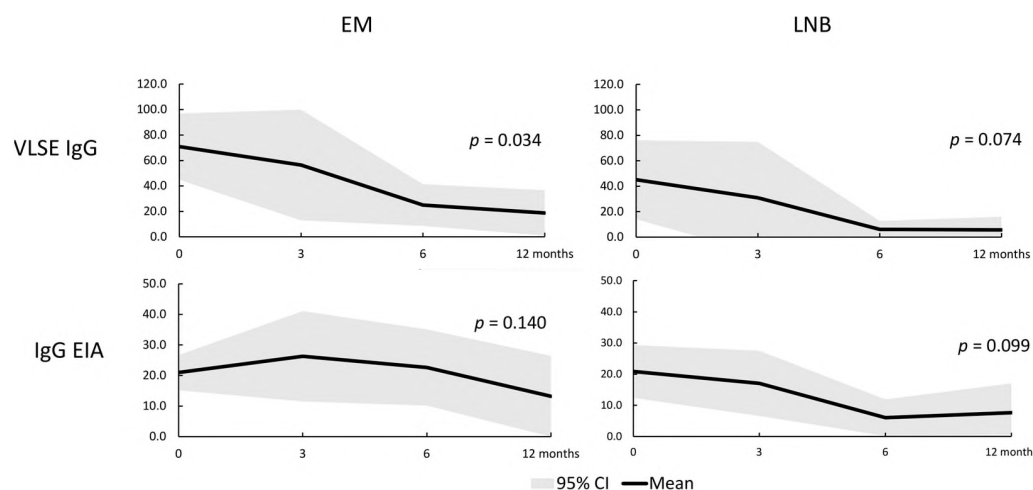


Figure 1. Anti-VIsE and standard Lyme EIA IgG antibody levels in monitoring erythema migrans and Lyme neuroborreliosis treatment.

In the LNB group, 7/21 (33%) tested positive in the VIsE assay, and 1 (5%) had an equivocal result. The median VIsE level was 13 RU/mL (interquartile range; 5–47 RU/mL). There was a non-significant decreasing trend ($p = 0.07$; Figure 1) in the level of anti-VIsE antibodies in this group. After treatment, none of the LNB patients displayed a decrease in antibody titers by a factor equal to or higher than four.

Subsequent tests for patients initially negative for C6 (or VlsE) showed no instances of seroconversion; all negative results remained negative, ambiguous results either remained unchanged or decreased, and the majority of initially positive results exhibited a decline.

The levels of Lyme EIA IgG did not change over time in both EM and LNB groups.

4. Discussion

In this study, we assessed the utility of serological tests employing C6 and VlsE antigens for the diagnosis and treatment monitoring of early LB in children. Prior research in the United States has demonstrated that enzyme immunoassays using C6 antigens can enhance the sensitivity of serological LB tests [17,37–39]. The usage of the VlsE peptide streamlines the process by requiring only a single test, while traditional whole-cell EIAs necessitate four separate tests. However, it is important to note that the specificity of the VlsE/C6 test may not match that of CTTT [25,40,41]. Furthermore, it is worth considering regional variations in test efficacy. In Europe, for instance, the C6 EIA is sometimes considered less sensitive than traditional EIAs because not all patients exhibit a response to the C6 peptide [42–44]. While the IR6 region is conserved, variations in four–five amino acid sequences have been observed among *Borrelia* genospecies [45]. Consequently, the sensitivity of the VlsE/C6 test tends to be higher in the USA, where *B. burgdorferi* sensu stricto predominates as the primary pathogenic species, in contrast to Europe, where there are at least three pathogenic species present. This regional variation may account for the differences in sensitivity observed [3,42,43].

Serological testing is recommended for the diagnosis of LB due to the diverse clinical picture, anatomical differences in the incidence of tick bites in children and missing erythema in the clinical picture [8,9]. Moreover, EM should be differentiated from bacterial cellulitis, eczema, mycosis, and allergic reactions to substances contained in tick saliva [46]. Although serological testing is not advocated for patients with EM, in the case of clinical uncertainties about a rash in LB, serological tests based on EIAs may be performed. In the case of positive and equivocal EIA results, the guidelines recommend WB, which is a time-consuming and expensive procedure that may give a false-negative result in the first weeks of infection [14,34,35]. All of this involves duplicating the visits of small patients, subsequent injections, and collecting serum for re-examination.

The results of our research indicate the usefulness of highly specific antigens in the diagnosis of early LB in children. All patients with EM who had a positive response in the standard EIA were also positive in the C6 antigen test. However, 12 out of 15 patients with LNB had a positive antibody response to the C6 antigen. Therefore, protocols using EIA with C6 could be used for the clinical practice of diagnosing LB in children, especially in patients with a high clinical suspicion of LB (i.e., with tick bites and a rash) [17,47]. Jansson et al.'s research proposed an algorithm with the two-EIA strategy for equivocal cases, where a test with the C6 antigen could be performed after performing a standard EIA on the remaining serum [47]. The authors suggest that if this algorithm had been applied to the 151 sera originally tested using the traditional two-tier strategy, it would have reduced the number of sera requiring WB by 50%, saving reagent costs and staff time. Additionally, it would allow routine laboratories to perform their own testing and confirmation for the majority of their LB patients, reducing turnaround times and the testing burden for reference laboratories, which can then focus on more complex cases [47].

Traditional serological detection of *B. burgdorferi* antibodies, such as EIA and WB, is not recommended for monitoring treatment response or resolving infection because IgG and IgM antibodies can remain elevated for years after infection, despite successful treatment [16,48]. This can lead to repeated unnecessary antibiotic treatment until the serological response is no longer observed. Moreover, for children in endemic areas, previous tick bites might be responsible for positive test results, as the antibodies against *B. burgdorferi* can persist for years even after successful treatment [16,49]. Therefore, a specific marker should be used to assess the effectiveness of LB therapy. The use of specific anti-VlsE antibodies as a marker to assess the effectiveness of LB therapy has been suggested

by several researchers [29,30,42,44]. There are several important features that such a marker should possess in order to be effective. It should have high specificity for the pathogen causing LB, should reflect the dynamics of the infection, and should be detectable soon after the infection occurs, allowing for early diagnosis and treatment initiation. Additionally, as the therapy progresses and becomes effective, the marker should decrease in concentration, indicating a positive response to treatment [50]. According to researchers, quantitative measurement of specific anti-VlsE antibodies, fulfills these criteria. These antibodies are highly specific to the pathogen causing LB, and their measurement can indicate the presence and intensity of the infection. Additionally, they have shown potential in reflecting the dynamics of the infection and responding to effective treatment [30,44]. In one of the first publications on this subject, Philipp et al. examined antibody titers against the VlsE/C6 peptide in rhesus monkeys and dogs that were infected with *B. burgdorferi*. The study included seven adult rhesus monkeys, and the researchers observed that there was a rise in anti-C6 IgG antibody titers for 12 weeks after the infection occurred. After the initiation of antibiotic therapy, a decrease in anti-C6 IgG antibody levels was observed in six out of the seven rhesus monkeys. This decrease occurred during a 9-week period of antibiotic therapy and continued until the antibodies completely disappeared 13 weeks after the end of the therapy (specifically, the 34th week after infection) [29]. In 2005, researchers examined the dynamics of anti-VlsE/C6 IgG antibodies in 120 patients with LB, and antibiotic therapy was implemented. Between 4 and 15 months after the treatment, 59.0% of the patients had a total decrease in anti-C6 IgG antibodies and 32.4% of the patients showed at least a four-fold drop in their level [30].

The current study found that there was a statistically significant decrease in the titers of anti-VlsE antibodies among children with EM after effective therapy. In the group of patients with LNB, a decrease in the level of antibodies was also observed after successful therapy, but it was not a statistically significant decrease ($p = 0.07$). In one of the studies also conducted in children with Lyme arthritis, the results revealed that the decline in antibodies to IR6 does not appear to be useful in assessing Lyme arthritis treatment, as most patients were still positive for IR6 four years after diagnosis [51]. In addition, the results of our study may be influenced by the different clinical course of LB in children and adults. In adults, radicular pain and paresis are more common symptoms, whereas in the pediatric population, facial nerve palsy and subacute meningitis are more frequently observed. Additionally, atypical symptoms such as fatigue, loss of appetite, and mood changes may occur in both children and adults. [52,53]. It is important to be aware of these various clinical features in children with suspected LNB in order to accurately diagnose and manage the disease [32,54]. Generally, the clinical outcome is significantly better in children compared to adults, and long-term neuropsychological disorders are not commonly seen in the pediatric population. In contrast, adults may experience cognitive disorders and persistent or recurrent neurological symptoms [55,56]. Additionally, regarding diagnostic testing, the sensitivity of the test using the VlsE/C6 antigen for neuroborreliosis in children may vary. In Europe, where *B. afzelii* and *B. garinii* are dominant in LNB and in the United States, where *B. burgdorferi sensu stricto* is dominant, the results in monitoring treatment may differ. This suggests that the specific *Borrelia* species present in the region can influence the sensitivity of the test and subsequently impact the diagnosis and monitoring of treatment efficacy [3,57,58].

Most of the previous research on the decline in anti-VlsE/C6 antibody levels primarily focused on adults, and the assessment of the decrease in the level of anti-VlsE/C6 antibodies in children with early LB has not been specifically investigated. It was later recognized that as the infection progresses, the quantitative C6 test used to assess response to treatment becomes less sensitive. Consequently, a decline in VlsE/C6 antibody titers was observed only in successfully treated patients with early localized or early disseminated LB and not in patients with late-stage LB [30]. This observation has clinical implications since information about the decline in VlsE/C6 antibody levels would be more useful in cases of late-stage LB. Late-stage LB refers to cases where the infection has progressed and potentially caused

more severe symptoms or complications. However, due to the reduced sensitivity of the C6 test in these cases, assessing treatment response or disease progression based on antibody titers becomes less reliable [30].

It is indeed important to note that while the decline in VlsE/C6 antibodies shows promise, the persistence of positive VlsE/C6 test results does not necessarily equate to an ongoing infection. It is possible for a significant proportion of patients to have persistently positive VlsE/C6 tests even after successful treatment. Therefore, a single VlsE/C6 antibody titer alone is not informative enough to determine the status of the infection after therapy. Instead, it should be considered as part of a longitudinal assessment of the patient's condition over time [59].

While our study provides valuable insights into the diagnostic potential of serological tests in pediatric Lyme borreliosis, we acknowledge several constraints that warrant consideration. Firstly, the discontinuation of C6 tests by the manufacturer limited our ability to comprehensively assess the diagnostic utility of the EIA test with C6 across the entire study group. This circumstance underscores the need for caution in interpreting the findings related to the C6 assay. Secondly, the ongoing COVID-19 pandemic posed logistical challenges, with parents facing difficulties in attending follow-up visits, thus impacting the completeness of data and reducing the sample size available for analysis. This limitation may influence the generalizability of our results, given the potential selection bias introduced by the constraints of the pandemic. Moreover, the nature of our study design, with follow-up dependent on parental attendance, led to missing data and limited our ability to conduct extensive follow-up examinations. This absence of long-term data may affect the depth of our understanding of the progression and outcomes of LB in the pediatric population. Lastly, the observation that nearly half of the patients with erythema migrans did not exhibit increased VlsE IgG levels poses a limitation on the potential use of this assay in treatment monitoring for this particular subgroup. Acknowledging these limitations is crucial for a nuanced interpretation of our findings, ensuring a balanced understanding of the scope and potential impact of our study.

5. Conclusions

The majority of children meeting the clinical criteria for Lyme disease, based on the evident presentation of erythema migrans, received appropriate treatment from family doctors. Nevertheless, these children were referred to specialist clinics for further care. Some children with erythema migrans tested negative for Lyme disease in serologic tests, even when using recombinant antigen-based assays. Clinical diagnosis at this disease stage should remain the gold standard for diagnostics and the basis for treatment initiation. A significant decrease in anti-VlsE antibody titers was observed during erythema migrans treatment, along with a decreasing trend in neuroborreliosis. This suggests the potential use of these antibodies in monitoring Lyme disease treatment in children. In summary, our study underscores the need for optimizing the diagnostic pathway for pediatric Lyme disease, especially in cases of erythema migrans, which can be accurately diagnosed clinically. The challenges posed by serologic tests in detecting Lyme disease in children, despite the use of recombinant antigens, highlight the importance of clinical diagnosis as the primary criterion for treatment initiation. Additionally, our findings suggest that anti-VlsE antibodies may serve as a valuable tool for monitoring the effectiveness of Lyme disease treatment in pediatric patients. These insights contribute to the ongoing efforts to improve diagnosis and care for pediatric Lyme disease cases.

Author Contributions: Conceptualization, M.W., K.T. and A.S.; data curation, M.W., D.L. and E.B.; formal analysis, M.W., K.T. and R.M.; funding acquisition, A.S.; investigation, M.W.; methodology, M.W., K.T. and R.M.; project administration, K.T. and A.S.; resources, A.S.; supervision, A.S.; validation, R.M. and A.S.; visualization, M.W. and K.T.; writing—original draft, M.W.; writing—review and editing, K.T., D.L. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Medical University of Białystok, Poland (grant no. SUB/1/DN/22/001/1148).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (approval numbers R-I-002/489/2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets used during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We extend our heartfelt gratitude to Małgorzata Wojtkowska for her invaluable contribution in the performing laboratory analyses on the patients' sera.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Steere, A.C.; Strle, F.; Wormser, G.P.; Hu, L.T.; Branda, J.A.; Hovius, J.W.; Li, X.; Mead, P.S. Lyme Borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 16090. [CrossRef]
2. Aguero-Rosenfeld, M.E.; Wang, G.; Schwartz, I.; Wormser, G.P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 484–509. [CrossRef] [PubMed]
3. Rudenko, N.; Golovchenko, M.; Grubhoffer, L.; Oliver, J.H. Updates on Borrelia Burgdorferi Senu Lato Complex with Respect to Public Health. *Ticks Tick Borne Dis.* **2011**, *2*, 123–128. [CrossRef]
4. Lohr, B.; Fingerle, V.; Norris, D.E.; Hunfeld, K.-P. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis: Current State of the Art and Future Perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2018**, *55*, 219–245. [CrossRef] [PubMed]
5. Cardenas-de la Garza, J.A.; De la Cruz-Valadez, E.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O. Clinical Spectrum of Lyme Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 201–208. [CrossRef]
6. Mullegger, R.R. Dermatological Manifestations of Lyme Borreliosis. *Eur. J. Dermatol.* **2004**, *14*, 296–309.
7. Steere, A.C.; Malawista, S.E.; Bartenhagen, N.H.; Spieler, P.N.; Newman, J.H.; Rahn, D.W.; Hutchinson, G.J.; Green, J.E.R.R.Y.; Snyderman, D.R.; Taylor, E. The Clinical Spectrum and Treatment of Lyme Disease. *Yale J. Biol. Med.* **1984**, *57*, 453.
8. Berglund, J.; Eitrem, R.; Ornstein, K.; Lindberg, A.; Ringnér, Å.; Elmrud, H.; Carlsson, M.; Runehagen, A.; Svanborg, C.; Norrby, R. An Epidemiologic Study of Lyme Disease in Southern Sweden. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1319–1324. [CrossRef]
9. Nigrovic, L.E.; Neville, D.N.; Balamuth, F.; Bennett, J.E.; Levas, M.N.; Garro, A.C.; For Pedi Lyme Net. A Minority of Children Diagnosed with Lyme Disease Recall a Preceding Tick Bite. *Ticks Tick Borne Dis.* **2019**, *10*, 694–696. [CrossRef]
10. Södermark, L.; Sigurdsson, V.; Näs, W.; Wall, P.; Trollfors, B. Neuroborreliosis in Swedish Children: A Population-Based Study on Incidence and Clinical Characteristics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 1052–1056. [CrossRef]
11. European Centre for Disease Prevention and Control. *A Systematic Literature Review on the Diagnostic Accuracy of Serological Tests for Lyme borreliosis*; Publications Office: Luxembourg, 2016.
12. Steere, A.C.; McHugh, G.; Damle, N.; Sikand, V.K. Prospective Study of Serologic Tests for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 188–195. [CrossRef]
13. Moore, A.; Nelson, C.; Molins, C.; Mead, P.; Schriefer, M. Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1169–1177. [CrossRef] [PubMed]
14. Halperin, J.J.; Baker, P.; Wormser, G.P. Common Misconceptions about Lyme Disease. *Am. J. Med.* **2013**, *126*, 264.e1–264.e7. [CrossRef] [PubMed]
15. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for Test Performance and Interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *JAMA* **1995**, *274*, 937. [CrossRef]
16. Feder, H.M.; Gerber, M.A.; Luger, S.W.; Ryan, R.W. Persistence of Serum Antibodies to Borrelia Burgdorferi in Patients Treated for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* **1992**, *15*, 788–793. [CrossRef] [PubMed]
17. Branda, J.A.; Linskey, K.; Kim, Y.A.; Steere, A.C.; Ferraro, M.J. Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease with Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *53*, 541–547. [CrossRef]
18. Lone, A.G.; Bankhead, T. The Borrelia Burgdorferi VlsE Lipoprotein Prevents Antibody Binding to an Arthritis-Related Surface Antigen. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3663–3670.e5. [CrossRef] [PubMed]
19. Davis, I.R.C.; McNeil, S.A.; Allen, W.; MacKinnon-Cameron, D.; Lindsay, L.R.; Bernat, K.; Dibernardo, A.; LeBlanc, J.J.; Hatchette, T.F. Performance of a Modified Two-Tiered Testing Enzyme Immunoassay Algorithm for Serologic Diagnosis of Lyme Disease in Nova Scotia. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01841-19. [CrossRef]
20. Commissioner, O. Of the FDA Clears New Indications for Existing Lyme Disease Tests that May Help Streamline Diagnoses. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-clears-new-indications-existing-lyme-disease-tests-may-help-streamline-diagnoses> (accessed on 24 October 2023).

21. Bankhead, T. Role of the VlsE Lipoprotein in Immune Avoidance by the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Immunopathol. Dis. Ther.* **2016**, *7*, 191–204. [CrossRef]
22. Norris, S.J. Vls Antigenic Variation Systems of Lyme Disease *Borrelia*: Eluding Host Immunity through Both Random, Segmental Gene Conversion and Framework Heterogeneity. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*, 471–489. [CrossRef]
23. Bubeck-Martinez, S. Immune Evasion of the Lyme Disease Spirochetes. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 873–878. [CrossRef] [PubMed]
24. Embers, M.E.; Jacobs, M.B.; Johnson, B.J.B.; Philipp, M.T. Dominant Epitopes of the C6 Diagnostic Peptide of *Borrelia burgdorferi* Are Largely Inaccessible to Antibody on the Parent VlsE Molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* **2007**, *14*, 931–936. [CrossRef] [PubMed]
25. Peltomaa, M.; McHugh, G.; Steere, A.C. The VlsE (IR6) Peptide ELISA in the Serodiagnosis of Lyme Facial Paralysis. *Otol. Neurotol.* **2004**, *25*, 838–841. [CrossRef]
26. Bacon, R.M.; Biggerstaff, B.J.; Schriefer, M.E.; Gilmore, R.D.; Philipp, M.T.; Steere, A.C.; Wormser, G.P.; Marques, A.R.; Johnson, B.J.B. Serodiagnosis of Lyme Disease by Kinetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant VlsE1 or Peptide Antigens of *Borrelia burgdorferi* Compared with 2-Tiered Testing Using Whole-Cell Lysates. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 1187–1199. [CrossRef] [PubMed]
27. Lahdenne, P.; Panelius, J.; Saxen, H.; Heikkilä, T.; Sillanpää, H.; Peltomaa, M.; Arnez, M.; Huppertz, H.-I.; Seppälä, I.J.T. Improved Serodiagnosis of Erythema Migrans Using Novel Recombinant Borrelial BBK32 Antigens. *J. Med. Microbiol.* **2003**, *52*, 563–567. [CrossRef]
28. Strobino, B.; Steinhagen, K.; Meyer, W.; Scheper, T.; Saschenbrecker, S.; Schlumberger, W.; Stöcker, W.; Gaito, A.; Fallon, B.A. A Community Study of *Borrelia burgdorferi* Antibodies among Individuals with Prior Lyme Disease in Endemic Areas. *Healthcare* **2018**, *6*, 69. [CrossRef]
29. Philipp, M.T.; Bowers, L.C.; Fawcett, P.T.; Jacobs, M.B.; Liang, F.T.; Marques, A.R.; Mitchell, P.D.; Purcell, J.E.; Ratterree, M.S.; Straubinger, R.K. Antibody Response to IR6, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of *Borrelia burgdorferi* Infection in Experimental Animals and in Humans. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 870–878. [CrossRef]
30. Philipp, M.T.; Wormser, G.P.; Marques, A.R.; Bittker, S.; Martin, D.S.; Nowakowski, J.; Dally, L.G. A Decline in C6 Antibody Titer Occurs in Successfully Treated Patients with Culture-Confirmed Early Localized or Early Disseminated Lyme Borreliosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2005**, *12*, 1069–1074. [CrossRef]
31. Lipsett, S.C.; Branda, J.A.; Nigrovic, L.E. Evaluation of the Modified Two-Tiered Testing Method for Diagnosis of Lyme Disease in Children. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00547-19. [CrossRef]
32. Mygland, A.; Ljøstad, U.; Fingerle, V.; Rupprecht, T.; Schmutzhard, E.; Steiner, I. European Federation of Neurological Societies EFNS Guidelines on the Diagnosis and Management of European Lyme Neuroborreliosis. *Eur. J. Neurol.* **2010**, *17*, 8.e1–16.e4. [CrossRef]
33. Lantos, P.M.; Rumbaugh, J.; Bockenstedt, L.K.; Falck-Ytter, Y.T.; Aguero-Rosenfeld, M.E.; Auwaerter, P.G.; Baldwin, K.; Bannuru, R.R.; Belani, K.K.; Bowie, W.R.; et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lyme Disease. *Arthritis Rheumatol.* **2021**, *73*, 12–20. [CrossRef]
34. Lyme Disease Updates and New Educational Tools for Clinicians, Centers for Disease Control and Prevention Center for Preparedness and Response. Available online: https://emergency.cdc.gov/coca/calls/2021/callinfo_052021.asp (accessed on 19 February 2023).
35. Pancewicz, S.; Moniuszko-Malinowska, A.; Garlicki, A.; Grygorczuk, S.; Czupryna, P.; Dunaj, J. Diagnosis and Treatment of Lyme Borreliosis. Standards of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists. Available online: http://www.pteilchz.org.pl/wp-content/uploads/2018/11/borelioza_z_lyme_2018.pdf (accessed on 19 February 2023).
36. Flisiak, R.; Pancewicz, S. Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases [Diagnostics and treatment of Lyme borreliosis. Recommendations of Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases]. *Przegl. Epidemiol.* **2008**, *62*, 193–199.
37. Branda, J.A.; Strle, K.; Nigrovic, L.E.; Lantos, P.M.; Lepore, T.J.; Damle, N.S.; Ferraro, M.J.; Steere, A.C. Evaluation of Modified 2-Tiered Serodiagnostic Testing Algorithms for Early Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 1074–1080. [CrossRef]
38. Pegalajar-Jurado, A.; Schriefer, M.E.; Welch, R.J.; Couturier, M.R.; MacKenzie, T.; Clark, R.J.; Ashton, L.V.; Delorey, M.J.; Molins, C.R. Evaluation of Modified Two-Tiered Testing Algorithms for Lyme Disease Laboratory Diagnosis Using Well-Characterized Serum Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e01943-17. [CrossRef]
39. Molins, C.R.; Delorey, M.J.; Sexton, C.; Schriefer, M.E. Lyme Borreliosis Serology: Performance of Several Commonly Used Laboratory Diagnostic Tests and a Large Resource Panel of Well-Characterized Patient Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 2726–2734. [CrossRef] [PubMed]
40. Baarsma, M.E.; Schellekens, J.; Meijer, B.C.; Brandenburg, A.H.; Souilljee, T.; Hofhuis, A.; Hovius, J.W.; van Dam, A.P. Diagnostic Parameters of Modified Two-Tier Testing in European Patients with Early Lyme Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 2143–2152. [CrossRef] [PubMed]
41. Hauser, U. Modified Interpretation Criteria Significantly Improve Performance of Commercially Available Confirmatory Assays for the Serodiagnosis of Lyme Borreliosis: A Case-Control Study with Clinically Defined Serum Samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 529–539. [CrossRef] [PubMed]
42. Sillanpää, H.; Lahdenne, P.; Sarvas, H.; Arnez, M.; Steere, A.; Peltomaa, M.; Seppälä, I. Immune Responses to Borrelial VlsE IR6 Peptide Variants. *Int. J. Med. Microbiol.* **2007**, *297*, 45–52. [CrossRef] [PubMed]

43. Tjernberg, I.; Sillanpää, H.; Seppälä, I.; Eliasson, I.; Forsberg, P.; Lahdenne, P. Antibody Responses to Borrelia IR(6) Peptide Variants and the C6 Peptide in Swedish Patients with Erythema Migrans. *Int. J. Med. Microbiol.* **2009**, *299*, 439–446. [[CrossRef](#)]
44. Marangoni, A.; Moroni, A.; Accardo, S.; Cevenini, R. Borrelia Burgdorferi VlsE Antigen for the Serological Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27*, 349–354. [[CrossRef](#)]
45. Göttner, G.; Schulte-Spechtel, U.; Wilske, B. Heterogeneity of the Immunodominant Surface Protein VlsE among the Three Genospecies of Borrelia Burgdorferi Pathogenic for Humans. *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *293* (Suppl. S37), 172–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bryant, K.A.; Marshall, G.S. Clinical Manifestations of Tick-Borne Infections in Children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2000**, *7*, 523–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jansson, C.; Carlsson, S.-A.; Granlund, H.; Wahlberg, P.; Nyman, D. Analysis of Borrelia Burgdorferi IgG Antibodies with a Combination of IgG ELISA and VlsE C6 Peptide ELISA. *Clin. Microbiol. Infect.* **2005**, *11*, 147–150. [[CrossRef](#)]
48. Mavin, S.; Watson, E.J.; Evans, R. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis in Scottish Patients: A Novel Approach. *Br. J. Biomed. Sci.* **2014**, *71*, 51–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wozińska-Klepadło, M.; Toczyłowski, K.; Sulik, A. Challenges and New Methods in the Diagnosis of Lyme Disease in Children. *Prz. Epidemiol.* **2020**, *74*, 652–661. [[CrossRef](#)]
50. Wojciechowska-Koszko, I.; Mnichowska-Polanowska, M.; Kwiatkowski, P.; Roszkowska, P.; Sienkiewicz, M.; Dołęgowska, B. Immunoreactivity of Polish Lyme Disease Patient Sera to Specific Borrelia Antigens-Part 1. *Diagnostics* **2021**, *11*, 2157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Heikkilä, T.; Huppertz, H.-I.; Seppälä, I.; Sillanpää, H.; Saxen, H.; Lahdenne, P. Recombinant or Peptide Antigens in the Serology of Lyme Arthritis in Children. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 1888–1894. [[CrossRef](#)]
52. Kozak, S.; Kaminiów, K.; Kozak, K.; Paprocka, J. Lyme Neuroborreliosis in Children. *Brain Sci.* **2021**, *11*, 758. [[CrossRef](#)]
53. Hansen, K.; Crone, C.; Kristoferitsch, W. Lyme Neuroborreliosis. *Handb. Clin. Neurol.* **2013**, *115*, 559–575. [[CrossRef](#)]
54. Broekhuijsen-van Henten, D.M.; Braun, K.P.J.; Wolfs, T.F.W. Clinical Presentation of Childhood Neuroborreliosis; Neurological Examination May Be Normal. *Arch. Dis. Child.* **2010**, *95*, 910–914. [[CrossRef](#)]
55. Wickström, R.; Fowler, Å.; Goiny, M.; Millischer, V.; Ygberg, S.; Schwieler, L. The Kynurenine Pathway Is Differentially Activated in Children with Lyme Disease and Tick-Borne Encephalitis. *Microorganisms* **2021**, *9*, 322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Halperin, J.J.; Shapiro, E.D.; Logigian, E.; Belman, A.L.; Dotevall, L.; Wormser, G.P.; Krupp, L.; Gronseth, G.; Bever, C.T. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology Practice Parameter: Treatment of Nervous System Lyme Disease (an Evidence-Based Review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2007**, *69*, 91–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Rožič, M.; Lah, L.L.; Ružič-Sabljić, E.; Kastrin, A.; Arnež, M. Lyme Neuroborreliosis in Children: Etiology and Comparison of Clinical Findings of Lyme Neuroborreliosis Caused by Borrelia Garinii and Borrelia Afzelii. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2019**, *38*, e279–e284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Petridou, C.; Lovett, J.; Ross Russell, A.; Jeppesen, C.; Sheridan, L.; Okyere, S.; Saeed, K.; Lee, M.; Dryden, M. A Retrospective Observational Study of Lyme Neuroborreliosis in the Southwest of England. *Clin. Infect. Pract.* **2020**, *6*, 100017. [[CrossRef](#)]
59. Kannian, P.; McHugh, G.; Johnson, B.J.B.; Bacon, R.M.; Glickstein, L.J.; Steere, A.C. Antibody Responses to Borrelia Burgdorferi in Patients with Antibiotic-Refractory, Antibiotic-Responsive, or Non-Antibiotic-Treated Lyme Arthritis. *Arthritis Rheum.* **2007**, *56*, 4216–4225. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

11. Streszczenie w języku polskim

Borelioza z Lyme (LB) to choroba występująca głównie na obszarze Euroazji oraz Ameryki Północnej, przenoszona przez kleszcze, wywołwana przez krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato. W Europie chorobę najczęściej wywołują genogatunki *B. garinii*, *B. afzelii* oraz *B. burgdorferi* sensu stricto. Jej rozprzestrzenianie się dynamicznie wzrasta, co związane jest ze zmianami klimatycznymi, sprzyjającymi ekspansji kleszczy. Choroba może przybierać różne formy, a jej rozpoznanie bywa trudne ze względu na zróżnicowany obraz kliniczny i często niespecyficzne objawy.

Okres wylegania boreliozy wynosi zwykle od 3 do 30 dni, choć objawy mogą też pojawić się po kilku miesiącach od zarażenia. We wczesnym stadium choroby może pojawić się na skórze zamiana określana jako rumień wędrujący. Następnie choroba może przechodzić do stadium rozsianego, z objawami ze strony układu nerwowego, kostno-stawowego lub serca. Diagnostyka kliniczna boreliozy wspierana jest przez wyniki badań laboratoryjnych. Wyjątkiem jest rumień wędrujący, którego obecność na skórze pozwala na rozpoznanie choroby w oparciu o obraz kliniczny. Metody diagnostyczne stosowane w przypadku boreliozy to testy immunoenzymatyczne (EIA), Western blot (WB) oraz, w mniejszym stopniu, techniki biologii molekularnej. Metody te różnią się czułością, swoistością oraz kosztem wykonania. Ograniczenia konwencjonalnej dwuetapowej metody diagnostycznej (CTTT ang. Conventional Two-Tiered Testing), polegającej na wykonaniu testu EIA, a następnie, w drugim etapie, testu WB, zainicjowały wprowadzenie zmodyfikowanego badania dwuetapowego (MTTT ang. Modified Two-Tiered Testing Method), wykorzystującego testy z antygenami rekombinowanymi (VlsE i C6). Oznaczanie miana przeciwciał anti-VlsE oraz anti-C6 okazało się także obiecujące w monitorowaniu skuteczności leczenia LB u dorosłych.

W kontekście powyższych wyzwań, przeprowadzono badania mające na celu zrozumienie skuteczności profilaktyki oraz doskonalenie diagnostyki boreliozy u dzieci. Celem pracy była ocena wiedzy, postaw i praktyk profilaktycznych wśród respondentów z północno-wschodniej Polski dotyczących boreliozy oraz zidentyfikowanie czynników wpływających na postawy i praktyki ludzi w zakresie profilaktyki przeciwko chorobom przenoszonym przez kleszcze. Ponadto porównano powszechnie zaakceptowany dwuetapowy algorytm diagnostyczny LB wykorzystujący testy EIA i WB z proponowanym, alternatywnym algorytmem z użyciem testów EIA wykrywających antygeny rekombinowane (VlsE i C6), biorąc pod uwagę również zastosowanie tych testów w monitorowaniu skuteczności leczenia LB.

W pierwszej pracy oryginalnej z cyklu prac oceniano wiedzę, postawy i praktyki profilaktyczne mieszkańców obszaru endemicznego w Polsce. Do badania zakwalifikowano 406 uczestników z północno-wschodniej Polski. Około 41% respondentów zostało ukłutych przez kleszcza w przeszłości, 16% w ciągu ostatniego roku, a 31% potwierdziło ukłucie swoich dzieci. Uczestnicy często korzystali z Internetu i porad lekarzy. Ponad połowa badanych uznała choroby przenoszone przez kleszcze za co najmniej tak niebezpieczne, jak choroby układu sercowo-naczyniowego czy nowotwory. Zdecydowana większość ankietowanych osób stosowała prawidłowe metody ochrony przed ukłuciami i słusznie nie oczekiwała poekspozycyjnej profilaktyki antybiotykowej, która została zaordynowana jedynie u 12% osób po ukłuciu przez kleszcza. Ujawniono jednak istotne braki w wiedzy i liczne błędne przekonania na temat choroby. Prawie co czwarty ankietowany nieprawidłowo zidentyfikował kleszcza na ilustracji. Aż 20% było przekonanych o wertykalnej transmisji boreliozy z matki na dziecko, a prawie 60% uważało, że borelioza jest chorobą nieuleczalną. Ponad połowa

respondentów obawia się fragmentów kleszcza pozostających w skórze po jego usunięciu, jednocześnie uważając, że nie należy usuwać kleszcza samodzielnie. Niespełna połowa respondentów była pozytywnie nastawiona do szczepień przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu (KZM). Obecnie nie ma dostępnej i zarejestrowanej szczepionki przeciwko LB, dlatego w naszym badaniu zadaliśmy pytania oceniające nastawienie do szczepienia przeciwko innej chorobie odkleszczowej, jaką jest KZM. Prace nad szczepieniem przeciwko LB ciągle trwają, a sukces szczepionki przeciwko KZM sugeruje, że może to być efektywne podejście do zmniejszenia częstości występowania LB. Ponadto nasze badanie pozwoliło ustalić, że niedawne ukłucie przez kleszcza było powiązane z wyższym poziomem wiedzy, prawidłowym postępowaniem profilaktycznym i pozytywnym nastawieniem do szczepionki przeciwko KZM.

Drugie prace dotyczyły diagnostyki LB, zwracając uwagę na możliwe modyfikacje w dwuetapowym teście serologicznym. Łącznie przebadano 354 dzieci, z czego 70 włączono do analizy (49 z rumieniem wędrującym i 21 z neuroboreliozą). Wykorzystanie antygenów rekombinowanych, takich jak VlsE i C6, zdaje się być obiecującą alternatywą, szczególnie we wczesnych stadiach choroby. Badanie przeprowadzone na dzieciach z objawami sugerującymi LB podkreśla potencjalną przydatność antygeny C6 jako narzędzia diagnostycznego. Przedstawione wyniki analizy przeciwciał i ich zmian w czasie leczenia rzucają światło na potencjalne zastosowania tych testów w monitorowaniu skuteczności terapii. Jednakże, ważne jest ostrożne interpretowanie wyników w kontekście klinicznym, gdyż przeciwciała mogą być wykrywane przez długi czas po skutecznym leczeniu zakażenia.

Sformułowano następujące wnioski:

1. Respondenci mieszkający w północno-wschodniej Polsce uważają choroby przenoszone przez kleszcze za istotne zagrożenie dla zdrowia swojego i swoich rodzin, zbliżone do chorób nowotworowych i sercowo-naczyniowych.
2. W większości przypadków respondenci stosowali rekomendowane sposoby ograniczenia narażenia na ukłucia kleszczy oraz zapobiegania zachorowaniu na boreliozę. W niewielkim odsetku stosowano profilaktyczną antybiotykoterapię u respondentów lub ich dzieci.
3. Większość respondentów czerpała swoją wiedzę na temat chorób przenoszonych przez kleszcze z Internetu oraz od opiekujących się nimi lekarzy i te źródła należy wykorzystać, aby poszerzyć wiedzę populacji na temat tych chorób.
4. Większość dzieci spełniających kryteria kliniczne rozpoznania boreliozy z uwagi na oczywisty obraz rumienia wędrującego było adekwatnie leczonych przez lekarzy rodzinnych. Pomimo tego dzieci te zostały skierowane do poradni specjalistycznej celem objęcia dalszą opieką.
5. Część dzieci z rumieniem wędrującym ma ujemne wyniki badań serologicznych w kierunku boreliozy pomimo użycia testów z antygenami rekombinowanymi. Rozpoznanie kliniczne w tym stadium choroby powinno pozostawać złotym standardem diagnostyki i podstawą włączenia leczenia.
6. Zaobserwowano istotny spadek miana przeciwciał przeciwko rekombinowanemu białku VlsE w trakcie leczenia rumienia wędrującego oraz trend spadkowy w neuroboreliozie co może wskazywać na potencjał wykorzystania tych przeciwciał w monitorowaniu leczenia boreliozy u dzieci.

12. Streszczenie w języku angielskim

Lyme disease (LD) is an illness primarily found in the regions of Eurasia and North America, transmitted by ticks, and caused by the *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes. In Europe, the disease is most commonly caused by the genospecies *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto. Its spread is dynamically increasing, linked to climate changes that favor the expansion of ticks. The disease can take various forms, and its diagnosis is often challenging due to the diverse clinical presentation and frequently nonspecific symptoms.

The incubation period of Lyme disease typically ranges from 3 to 30 days, although symptoms may also appear several months after infection. In the early stage of the disease a rash known as erythema migrans may appear. The infection can then progress to a disseminated stage, with symptoms involving the nervous system, musculoskeletal system, or heart. Clinical diagnosis of Lyme disease is supported by laboratory test results. An exception is erythema migrans, whose presence on the skin allows for diagnosis based on the clinical picture. Diagnostic methods used in Lyme disease include enzyme immunoassays (EIA), Western blot (WB), and to a lesser extent, molecular biology techniques. These methods vary in sensitivity, specificity, and cost. Limitations of the conventional two-tiered diagnostic method (CTTT), which involves first-tier EIA test followed by a WB test in the second step, have led to the introduction of a modified two-tiered testing method (MTTT), utilizing tests with recombinant antigens (VlsE and C6). Measuring the titers of anti-VlsE and anti-C6 antibodies has also shown promise in monitoring the effectiveness of LB treatment in adults.

In the context of the aforementioned challenges, current research was conducted to understand the effectiveness of prevention and to refine the diagnostics of Lyme disease in children. The aim of the study was to assess the knowledge, attitudes, and preventive practices among respondents from northeastern Poland regarding Lyme disease, and to identify factors influencing people's attitudes and practices in the prevention of tick-borne diseases. Additionally, the commonly accepted two-tiered diagnostic algorithm for LB using EIA and WB tests was compared with the proposed alternative algorithm using EIA tests detecting recombinant antigens (VlsE and C6), also considering the application of these tests in monitoring the effectiveness of LB treatment.

In the first original study of the series, the knowledge, attitudes, and preventive practices of residents in an endemic area in Poland were evaluated. A total of 406 participants from northeastern Poland were included in the study. About 41% of respondents had been bitten by a tick in the past, 16% within the last year, and 31% confirmed their children had been bitten. Participants frequently used the Internet and doctors' advice. Over half of the respondents considered diseases transmitted by ticks to be at least as dangerous as cardiovascular diseases or cancers. The vast majority of surveyed people applied correct methods of protection against tick bites and rightly did not expect post-exposure antibiotic prophylaxis, which was prescribed only to 12% of individuals after a tick bite. However, significant gaps in knowledge and numerous misconceptions about the disease were revealed. Nearly one in four respondents incorrectly identified a tick in an illustration. As many as 20% believed in vertical transmission of Lyme disease from mother to child, and almost 60% thought that Lyme disease is incurable. Over half of the respondents feared fragments of the tick remaining in the skin after its removal, while believing that the tick should not be removed independently. Just under half of the respondents were positively inclined towards vaccinations against Tick-Borne Encephalitis (TBE). Currently, there is no available and registered vaccine against LB, so in our study,

we asked questions evaluating the attitude towards vaccination against another tick-borne disease, TBE. Efforts to develop a vaccine against LB are ongoing, and the success of the TBE vaccine suggests that it may be an effective approach to reducing the incidence of LB. Moreover, our study established that a recent tick bite was associated with a higher level of knowledge, correct preventive behavior, and a positive attitude towards the TBE vaccine.

The second study focused on improving the diagnostics of LB, with an emphasis on modifications in the two-tiered serological test. A total of 354 children were examined, of which 70 were included in the analysis (49 with erythema migrans and 21 with neuroborreliosis). The use of recombinant antigens, such as VlsE and C6, appears to be a promising alternative, especially in the early stages of the disease. The study conducted on children with symptoms suggestive of LB highlights the potential usefulness of the C6 antigen as a diagnostic tool. The presented results of the antibody analysis and their changes during treatment shed light on the potential applications of these tests in monitoring the effectiveness of therapy. However, it is important to interpret the results cautiously in a clinical context, as antibodies can be detected for a long time after successful treatment of the infection.

The following conclusions were formulated:

1. Respondents living in northeastern Poland consider diseases transmitted by ticks as a significant health threat to themselves and their families, comparable to cancer and cardiovascular diseases.
2. In most cases, respondents applied recommended methods to reduce exposure to tick bites and to prevent Lyme disease. In a small percentage, prophylactic antibiotic therapy was prescribed for respondents or their children.
3. Most respondents obtained their knowledge about tick-borne diseases from the Internet and from their doctors, and these sources should be utilized to expand the population's knowledge about these diseases.
4. Most children meeting the clinical criteria for the diagnosis of Lyme disease, due to the obvious picture of erythema migrans, were adequately treated by general practitioners. Despite this, these children were referred to specialist clinics for further care.
5. Some children with erythema migrans have negative serological test results for Lyme disease despite the use of tests with recombinant antigens. Clinical diagnosis at this stage of the disease should remain the gold standard of diagnostics and the basis for initiating treatment.
6. A significant decrease in the titer of antibodies against the recombinant VlsE protein during the treatment of erythema migrans and a downward trend in neuroborreliosis were observed, which may indicate the potential of using these antibodies to monitor the treatment of Lyme disease in children.

13. Piśmiennictwo

1. Agüero-Rosenfeld, M.E.; Wang, G.; Schwartz, I.; Wormser, G.P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 484–509, doi:10.1128/CMR.18.3.484-509.2005.
2. Hügli, D.; Moret, J.; Rais, O.; Moosmann, Y.; Erard, P.; Malinverni, R.; Gern, L. Tick Bites in a Lyme Borreliosis Highly Endemic Area in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **2009**, *299*, 155–160, doi:10.1016/j.ijmm.2008.06.001.
3. Cardenas-de la Garza, J.A.; De la Cruz-Valadez, E.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O. Clinical Spectrum of Lyme Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 201–208, doi:10.1007/s10096-018-3417-1.
4. Chason, M.E.; Monaghan, M.; Wang, J.; Cheng, Y.; DeBiasi, R.L. Symptom Resolution in Pediatric Patients With Lyme Disease. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **2019**, *8*, 170–173, doi:10.1093/jpids/piy067.
5. Effect of Climate Change on Lyme Disease Risk in North America - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19008966/> (accessed on 7 December 2022).
6. Amicizia, D.; Domnich, A.; Panatto, D.; Lai, P.L.; Cristina, M.L.; Avio, U.; Gasparini, R. Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Europe and Its Prevention by Available Vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 1163–1171, doi:10.4161/hv.23802.
7. Valneva Completes Recruitment for Phase 2 Studies of Its Lyme Disease Vaccine Candidate VLA15 – Valneva.
8. Schwartz, A.M.; Mackeprang, J.M.; Mead, P.S.; Hinckley, A.F. Effectiveness of Personal Protection Measures against Lyme Disease: A Review of Epidemiologic Studies from the United States. *Zoonoses Public Health* **2022**, doi:10.1111/zph.12984.
9. Septfons, A.; Fignon, J.; Gautier, A.; Soullier, N.; de Valk, H.; Desenclos, J.-C. Increased Awareness and Knowledge of Lyme Borreliosis and Tick Bite Prevention among the General Population in France: 2016 and 2019 Health Barometer Survey. *BMC Public Health* **2021**, *21*, 1808, doi:10.1186/s12889-021-11850-1.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Recommendations for Test Performance and Interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **1995**, *44*, 590–591.
11. CDC Lyme Disease Home | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/lyme/index.html> (accessed on 19 February 2023).
12. Krzemień, P.J. ROLE OF VlsE/C6 ANTIGEN AS A MARKER FOR EARLY LYME BORRELIOSIS DIAGNOSIS AND MONITORING THE EFFECTIVENESS OF ITS TREATMENT. *Health Probl. Civiliz.* **2017**, *11*, 87–92, doi:10.5114/hpc.2017.69023.
13. Steere, A.C.; McHugh, G.; Damle, N.; Sikand, V.K. Prospective Study of Serologic Tests for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2008**, *47*, 188–195, doi:10.1086/589242.
14. Moore, A.; Nelson, C.; Molins, C.; Mead, P.; Schriefer, M. Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1169–1177, doi:10.3201/eid2207.151694.
15. Halperin, J.J.; Baker, P.; Wormser, G.P. Common Misconceptions about Lyme Disease. *Am. J. Med.* **2013**, *126*, 264.e1-7, doi:10.1016/j.amjmed.2012.10.008.
16. Feder, H.M.; Gerber, M.A.; Luger, S.W.; Ryan, R.W. Persistence of Serum Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Patients Treated for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **1992**, *15*, 788–793, doi:10.1093/clind/15.5.788.
17. Branda, J.A.; Linskey, K.; Kim, Y.A.; Steere, A.C.; Ferraro, M.J. Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease with Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2011**, *53*, 541–547, doi:10.1093/cid/cir464.

18. Lone, A.G.; Bankhead, T. The *Borrelia burgdorferi* VlsE Lipoprotein Prevents Antibody Binding to an Arthritis-Related Surface Antigen. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3663-3670.e5, doi:10.1016/j.celrep.2020.02.081.
19. Davis, I.R.C.; McNeil, S.A.; Allen, W.; MacKinnon-Cameron, D.; Lindsay, L.R.; Bernat, K.; DiBernardo, A.; LeBlanc, J.J.; Hatchette, T.F. Performance of a Modified Two-Tiered Testing Enzyme Immunoassay Algorithm for Serologic Diagnosis of Lyme Disease in Nova Scotia. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01841-19, doi:10.1128/JCM.01841-19.
20. Commissioner, O. of the FDA Clears New Indications for Existing Lyme Disease Tests That May Help Streamline Diagnoses Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-clears-new-indications-existing-lyme-disease-tests-may-help-streamline-diagnoses> (accessed on 24 October 2023).
21. Philipp, M.T.; Bowers, L.C.; Fawcett, P.T.; Jacobs, M.B.; Liang, F.T.; Marques, A.R.; Mitchell, P.D.; Purcell, J.E.; Ratterree, M.S.; Straubinger, R.K. Antibody Response to IR6, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of *Borrelia burgdorferi* Infection in Experimental Animals and in Humans. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 870–878, doi:10.1086/323392.

14. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenia o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej

“Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland” opublikowanej w Vaccines MDPI 2023 ; 10, 12, 12 pp, ID 2163

Imię i Nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant-lek. Marta Wozińska	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu	55%
dr.n.med Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy , analiza statystyczna	15%
lek. Ewa Bojkiewicz	Opracowanie pytań ankietowych	10%
lek. Dawid Lewandowski	Gromadzenie ankiet	5%
Dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, ocena merytoryczna pracy	15%

“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort” opublikowanej w Diagnostics MDPI 2023;

Imię i Nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant-lek. Marta Wozińska	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu	55%
dr.n.med Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy	15%
lek. Ewa Bojkiewicz	Gromadzenie materiału badawczego	5%
lek. Dawid Lewandowski	Gromadzenie materiału badawczego	5%
dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, ocena merytoryczna pracy	15%
dr hab. Robert Milewski	Analiza statystyczna	5%

„ Wyzwania i nowe możliwości w diagnostyce boreliozy u dzieci ”; opublikowanej w Przegląd Epidemiologiczny 2020; 74, 4, s. 652-661

Imię i Nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant-lek. Marta Wozińska	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu	55%
dr.n.med Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy	25%
dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, ocena merytoryczna pracy	20%

Kacper Toczyłowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland*” autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Sulik Artur, opublikowanej w Vaccines MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ;; ***Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 15% , polegał ocenie merytorycznej pracy, analizie statystycznej wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Ewa Bojkiewicz
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland*” autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Sulik Artur, opublikowanej w Vaccines MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ;; ***Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 10% , polegał na pomocy w opracowaniu pytań ankietowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ewa Bojkiewicz

Dawid Lewandowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland*” autorów Wozńska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Sulik Artur, opublikowanej w Vaccines MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ;; ***Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 5 %, polegał na gromadzeniu ankiet do badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozńską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Dawid Lewandowski

Dr hab.n.med Artur Sulik
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland” autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Sulik Artur, opublikowanej w Vaccines MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ;; ***Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 15% polegał na opracowaniu koncepcji, projektu pracy, i jej ocenie merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



dr hab. Robert Milewski, prof. UMP

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

imię i nazwisko współautora

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”; autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik Artur, opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **;*Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 5 %, polegał na analizie statystycznej danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Ewa Bojkiewicz
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”; autorów Wosińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik Artur, opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **‘Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych’**, wynoszący 5 %, polegał na gromadzeniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wosińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ewa Bojkiewicz

Dawid Lewandowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”; autorów Wosińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik Artur, opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **;*Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 5 %, polegał na gromadzeniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wosińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Dawid Lewandowski

Kacper Toczyłowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”; autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik Artur, opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **;*Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 15 %, polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Dr hab.n. med. Artur Sulik
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“*Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort*”; autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowski. D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik Artur, opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej ;***Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych***”, wynoszący 15 %, polegał na opracowanie koncepcji, projektu pracy, i jej ocenie merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Dr hab. n. med. Artur Sulik
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“*Wyzwania i nowe możliwości w diagnostyce boreliozy u dzieci*”; opublikowanej w Przegląd Epidemiologiczny 2020; autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Sulik A., opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **“Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych”**, wynoszący 20 %, polegał na ocenie merytorycznej pracy, pomocy przy przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Artur Sulik

Kacper Toczyłowski
imię i nazwisko współautora

Białystok, 06.12.2023r
miejsowość, data

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
nazwa jednostki

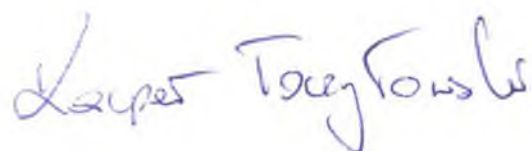
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“*Wyzwania i nowe możliwości w diagnostyce boreliozy u dzieci*”; opublikowanej w Przegląd Epidemiologiczny 2020; autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Sulik A., opublikowanej w Diagnostics MDPI wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej **“Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych”**, wynoszący 25 %, polegał na ocenie merytorycznej pracy, pomocy przy przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Martę Wozińską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Marta Wozińska

Klinika Obserwacyjno – Zakaźna Dzieci
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczenie autora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *“Knowledge, Attitudes, and Behaviors Regarding Lyme Borreliosis Prevention in the Endemic Area of Northeastern Poland”* autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowki D., Bojkiewicz E., Sulik A., opublikowanej w Vaccines MDPI 2023, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej *„Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych”*, wynoszący 55 %, polegał na zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu.
2. *“Diagnostic Precision in Lyme Borreliosis: Assessing VlsE and C6 Antigens in a Pediatric Cohort”* autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Lewandowki D., Bojkiewicz E., Milewski R., Sulik A., opublikowanej w Diagnostics MDPI 2023, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej *„Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych”*, wynoszący 55 %, polegał na zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu.
3. *„Wyzwania i nowe możliwości w diagnostyce boreliozy u dzieci”* autorów Wozińska M., Toczyłowski K., Sulik A., opublikowanej w Przegląd Epidemiologiczny 2020, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej *„Borelioza u dzieci: wieloaspektowe badanie dotyczące zapobiegania i nowych metod diagnostycznych”*, wynoszący 55 %, polegał na zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.